

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Papel de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en la expresión y función del TCR humano

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz de Garcillán Goyoaga

Director

José R. Regueiro González

Madrid, 2014

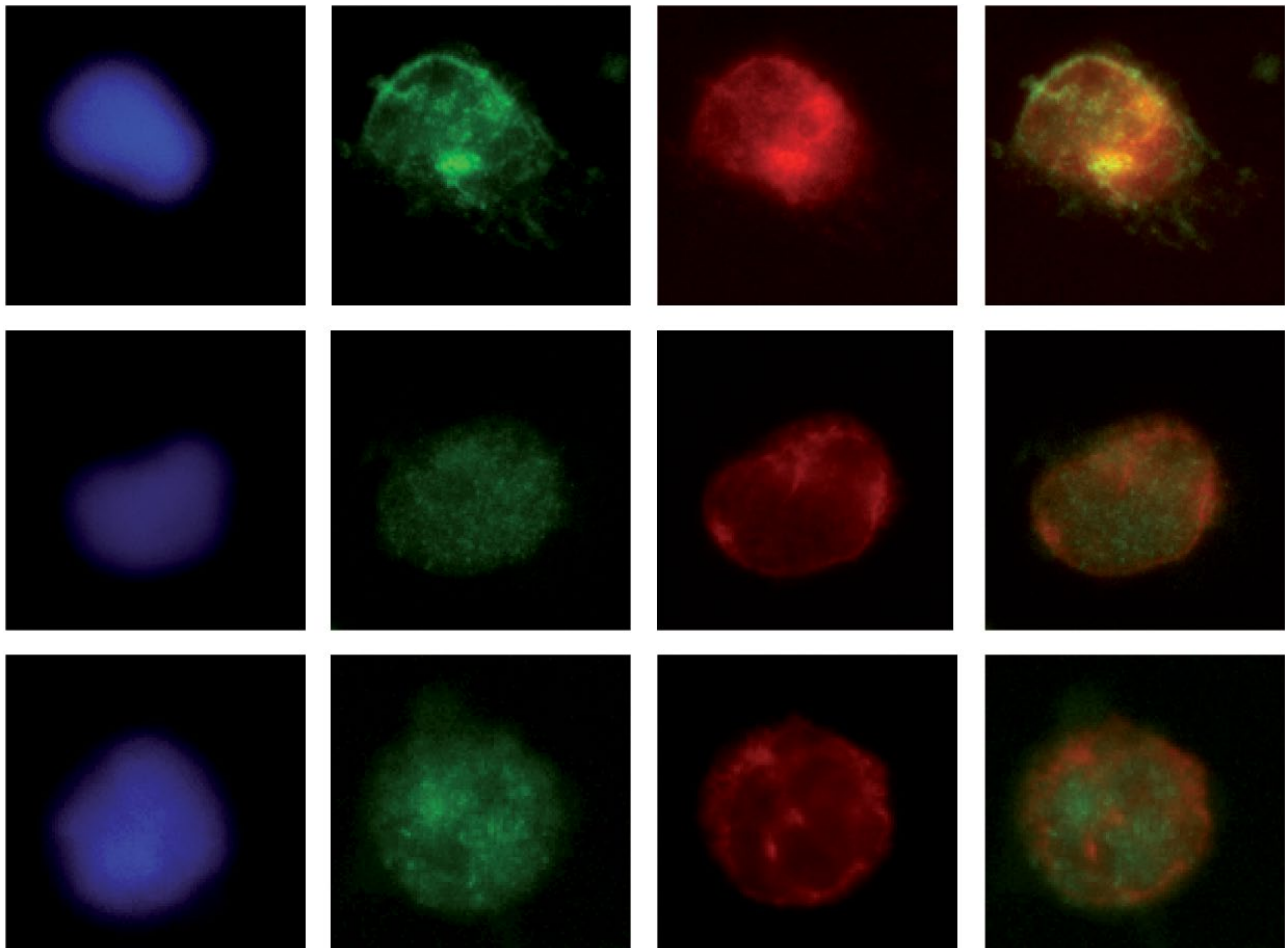


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

Papel de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en la expresión y función del TCR humano

Beatriz de Garcillán Goyoaga
MADRID, 2014



TESIS DOCTORAL

Papel de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en la expresión y función del TCR humano

Esta memoria ha sido presentada por la licenciada Beatriz de Garcillán Goyoaga para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado de Inmunología (RD778/98)

DIRECTOR DE LA TESIS

Dr. José R. Regueiro

Dpto. Microbiología I (Área Inmunología)

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Dpto. Microbiología I (Área Inmunología) y financiado con una Beca del Programa de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU-2008) y por los proyectos de investigación CAM P2010/BMD-2316, MINECO SAF2011-24235 y LAIR 2012/0070.

Requisitos para la Obtención del Título de Doctor con Mención Europea (Real Decreto 1393/2007)

Se podrá incluir en el anverso del título de Doctor/a la mención “Doctor/a europeo/a”, siempre que concurren las siguientes circunstancias:

Que durante el periodo de formación necesario para la obtención del título de doctor, el/la doctorando/a haya realizado una estancia mínima de tres meses fuera de España en una institución de enseñanza superior o centro de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea, cursando estudios o realizando trabajos de investigación que le hayan sido reconocidos por la Universidad Complutense. La estancia podrá realizarse de manera continua o de forma alterna, siempre que el cómputo total de la misma sea de, al menos, 90 días.

Que parte de la tesis doctoral, al menos el resumen y las conclusiones, se haya redactado y sea presentada en una de las lenguas oficiales de la Unión Europea distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España.

Que la tesis haya sido informada por un mínimo de dos expertos/as pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea distinto de España.

Que, al menos, un/a experto/a perteneciente a alguna institución de educación superior o centro de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea distinto de España, con el título de doctor/a, que no será nunca el responsable de la estancia mencionada en el apartado a) ni ninguno de los mencionados en el apartado c), haya formado parte del Tribunal evaluador de la tesis.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS	
Nombre del Doctorando	Beatriz de Garcillán Goyoaga
Título de la Tesis	Papel de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en la expresión y función del TCR humano
Facultad o Centro	Facultad de Medicina

DATOS DEL DIRECTOR	
Nombre Completo	José R. Regueiro González-Barros
Centro y dirección	Fac. de Medicina, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid
D.N.I., e-mail	50417137X, regueiro@med.ucm.es

	VALORACIÓN			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

La tesis. El trabajo que se somete a la consideración de la Comisión de doctorado para su posible defensa como tesis doctoral trata de entender el papel biológico de las cadenas invariantes CD3 en linfocitos T humanos mediante el análisis comparativo de la deficiencia inducida o congénita de las dos más homólogas (γ y δ). Los resultados indican que las deficiencias inducidas no recapitulan las congénitas ya que las primeras, a diferencia de las segundas, no logran expresar el TCR en la membrana, sino que lo retienen en el retículo endoplásmico. Por el camino, la doctoranda ha comprobado que las interacciones iniciales entre los dímeros CD3 $\gamma\epsilon$ o $\delta\epsilon$ y las cadenas variables del TCR parecen más flexibles de lo que se pensaba. Sus hallazgos indican que las isoformas del TCR sin CD3 γ o δ no pueden alcanzar la membrana normalmente, y sugieren que deben ser eventos intratímicos sobre poblaciones policlonales los que permiten a los linfocitos que alcanzan la periferia en pacientes una gran plasticidad de expresión del TCR, que puede resultar mayor o menor de lo esperado como se observa en linfocitos T deficientes de CD3 γ o δ , respectivamente. El mecanismo bioquímico exacto, no obstante, queda por determinar. Se acredita, además, que la deficiencia parcial de CD3 δ permite el desarrollo de los linfocitos T $\gamma\delta$, pero no T $\alpha\beta$, en consonancia con su respectiva capacidad de señalar vía su TCR, pero no de expresarlo. Por último, se demuestra que los linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺ están sobrerrepresentados selectivamente en dicha inmunodeficiencia, lo cual tiene utilidad diagnóstica. El trabajo ha sido desarrollado en España, Holanda y Alemania utilizando técnicas bioquímicas, citométricas y de biología celular y molecular de calidad, y está avalado con publicaciones en revistas de prestigio (*J Allergy Clin Immunol*, *J Clin Invest*). Por tanto reúne, a mi juicio, méritos más que suficientes para su defensa con mención europea.

La doctoranda. Beatriz ha demostrado desde 2008 condiciones que la sitúan en el mejor 5% de estudiantes que han pasado por el laboratorio en diversos aspectos de su formación científica: desarrollo y ejecución de nuevas técnicas; análisis y documentación de resultados; interacción con estudiantes, pares, supervisores y colaboradores en diversos laboratorios de varios países; comunicación de resultados en congresos internacionales; elaboración de informes inmunológicos, memorias y borradores de artículos científicos; dedicación y organización del laboratorio; independencia de criterio. Está sin duda preparada para un postdoc de excelencia, pero ¡espero que antes termine los artículos que en su CV figuran "en preparación"!

Madrid, a 2 de marzo de 2014

Fdo.:

Gracias:

A mi director de tesis, José R. Regueiro, por haberme aceptado en su grupo y por haberme enseñado y guiado durante estos años.

A los profesores del Departamento de Inmunología, en especial a Pedro Roda y Edgar Fernández-Malavé por tantos consejos, sugerencias y ayuda.

A todos los becarios presentes y pasados del Departamento de Inmunología, en especial a mis compañeros de laboratorio y despacho, por el buen ambiente, el trabajo en equipo, los congresos, las celebraciones y sobre todo por vuestra amistad.

A Pieter C. Res (AMC, Amsterdam) por enseñarme a crecer linfocitos T en respuesta a células *feeder*.

A Wolfgang Schamel y todo su grupo (Max Plank Institute of Immunobiology, Freiburg) por aceptarme allí durante 4 meses y hacerme sentir como en casa.

Al grupo de Marisa Toribio, en especial a Patricia Fuentes (CBMSO) por enseñarme a producir partículas lentivirales.

A los pacientes que han participado en este trabajo, a sus familiares y a sus médicos.

A Marina Mazariegos, Juan López Relano y Carmen Díez por haber leído esta memoria y haberme ayudado a mejorarla.

A mi amigo Pablo por ayudarme con el diseño y maquetación de esta tesis.

Y finalmente, a mi familia, novio y amigos por el interés que han mostrado durante estos años y por todo el apoyo que me han brindado.

00 /

Índice

01 / ABSTRACT	
02 / RESUMEN	9
03 / SUMMARY	11
04 / ABREVIATURAS	17
05 / INTRODUCCIÓN	24
	27
1. LINFOCITOS T	28
1.1. Linfocitos T $\alpha\beta$	28
1.2. Linfocitos T $\gamma\delta$	28
2. MADURACIÓN DE LOS LINFOCITOS T EN EL TIMO	30
2.1. Decisión de linaje	30
2.2. Selección	31
2.2.1. Linfocitos T $\alpha\beta$	31
2.2.2. Linfocitos T $\gamma\delta$	31
3. EL RECEPTOR PARA ANTÍGENO DEL LINFOCITO T (TCR)	32
3.1. Estructura	33
3.2. Valencia y estequiometría	34
3.3. Isotipos	36
3.4. Ensamblaje	36
3.5. Modificaciones post-traduccionales	37
3.6. Control de calidad y transporte a la membrana	38
3.7. Regulación de la expresión en membrana	41
3.8. Papel específico de las distintas cadenas invariantes del TCR	42
3.9. Señalización	44
4. DEFICIENCIAS CONGÉNITAS DEL TCR	46
4.1. Introducción	46
4.2. Deficiencia parcial de CD3 δ	47
06 / OBJETIVOS	50
07 / MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. MATERIALES	54
1.1. Software	54
1.2. Aparatos, consumibles y kits	54
1.3. Anticuerpos	55
1.4. Plásmidos	56
1.5. shRNA	57
1.6. Reactivos	57
1.7. Medios, tampones y soluciones	59
1.8. Células	60
2. MÉTODOS	61
2.1. Bioquímica	61
2.1.1. Lisados totales e inmunoprecipitación	61
2.1.2. Desglicosilación	61
2.1.3. SDS-PAGE y WB	61

2.2. Biología molecular	61
2.2.1. Transformación de bacterias competentes	61
2.2.2. Purificación de plásmidos	62
2.2.3. Producción de partículas lentivirales	62
2.3. Biología celular	63
2.3.1. Cultivos celulares	63
2.3.2. Obtención de líneas KD	63
2.3.3. Obtención de líneas celulares dependientes de feeder e IL-2	63
2.3.4. Citometría de flujo	64
2.3.5. Análisis funcional	64
2.3.6. Inmunofluorescencia	64
08 / RESULTADOS	65
1. DEFICIENCIA INDUCIDA DE CD3 γ O CD3 δ (Knock-Down)	66
1.1. Obtención de líneas Jurkat KD para CD3 γ o CD3 δ	66
1.2. Efecto del silenciamiento sobre la expresión del TCR en membrana	68
1.3. Incorporación de la cadena ζ al TCR	72
1.4. Transporte del TCR desde el RE al aparato de Golgi	73
1.5. Análisis estequiométrico de los intermediarios ensamblados en el RE	75
1.6. KD en otras líneas T y en linfocitos T primarios	76
2. DEFICIENCIA PARCIAL DE CD3 δ	78
2.1. Estudio del desarrollo T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$	78
2.2. Impacto de la deficiencia parcial de CD3 δ sobre la expresión del TCR	79
2.3. Señalización a través del TCR	81
2.4. Modulación y re-expresión del TCR	82
2.5. Expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4+	83
2.6. Fenotipo y función de los linfocitos T $\gamma\delta$ CD4+	86
09 / DISCUSIÓN	88
1. DEFICIENCIA INDUCIDA DE CD3 γ O CD3 δ (Knock-Down)	89
1.1. Relevancia de las líneas KD para CD3 γ o CD3 δ	89
1.2. Efecto del KD sobre las otras cadenas CD3	90
1.3. La ausencia de CD3 γ o CD3 δ impide la expresión del TCR en membrana	90
1.4. Los TCR que no incorporan CD3 γ o CD3 δ quedan retenidos en el RE	93
2. DEFICIENCIA PARCIAL DE CD3 δ	97
2.1. La expresión del TCR $\gamma\delta$ se reduce más que la del TCR $\alpha\beta$	97
2.2. Bloqueo en el desarrollo T $\alpha\beta$ pero no T $\gamma\delta$	98
2.3. Reducción en la señalización vía TCR $\alpha\beta$ pero no vía TCR $\gamma\delta$	100
2.4. Expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4+ en la deficiencia parcial de CD3 δ	101
10 / CONCLUSIONS	103
11 / PERSPECTIVAS	106
12 / BIBLIOGRAFÍA	109
13 / ANEXOS	119
1. CURRÍCULUM VÍTAE	120
2. PUBLICACIONES	124

01/

Abstract

01 /

Abstract

The TCR is composed of a variable heterodimer (either TCR $\alpha\beta$ or TCR $\gamma\delta$) and three invariant dimers (CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ and $\zeta\zeta$). The function of each invariant chain and the structural relationships among TCR subunits are still not fully understood. Despite the high homology between CD3 γ and CD3 δ , the clinical consequences of human deficiencies thereof are very different (mild and severe, respectively), and mouse models do not recapitulate human findings. To try to understand such disparities, we have analyzed the in vitro consequences of knocking down each chain in mature human T cells, and the in vivo effects of partial congenital CD3 δ deficiency. The general aim is to define the biological role of CD3 γ and CD3 δ in TCR assembly, expression and function and in T cell development.

Stable CD3 γ and CD3 δ KD Jurkat T cell lines were generated which showed, firstly, that both TCR α -CD3 $\delta\epsilon$ and TCR β -CD3 $\gamma\epsilon$ interactions are possible as a first step for TCR assembly, and not only the former as described in B cell microsomes. Secondly, TCR α was likely more promiscuous than TCR β , as it was found to bind not only CD3 $\delta\epsilon$ but also CD3 $\gamma\epsilon$ dimers. Lastly, both CD3 γ and CD3 δ were shown to be required for TCR egress from the ER and thus for its normal surface expression, supporting non-redundant roles for CD3 γ and CD3 δ in TCR shuttling to the cell surface as well as a TCR $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ stoichiometry.

Congenital partial CD3 δ deficiency, but not CD3 δ KD, caused a stronger impact in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ TCR surface expression, whereas signaling was impaired via the $\alpha\beta$, but not the $\gamma\delta$, TCR. Whether functional TCR expression plays a role in thymic development of $\gamma\delta$ T cell subsets has remained elusive. Here, we showed that $\gamma\delta$ T cells were less dependent than $\alpha\beta$ T cells on TCR expression for development in the thymus, as $\gamma\delta$ T cell numbers were normal whereas $\alpha\beta$ T cells were strongly reduced in the patients. Their $\gamma\delta$ T cells were diverse but enriched for a subset of otherwise rare CD4-expressing cells, which exhibited an activated phenotype and were refractory to further TCR stimulation. Upon long-term cultivation, patients' CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells retained surface CD4 and low but diverse TCR expression, indicating that they were not a result of peripheral oligoclonal expansion or CD4 upregulation in the CD4⁺ subset. Our findings may be of some diagnostic value to identify the molecular basis of primary immunodeficiencies: patients with T $\alpha\beta$ ⁺T $\gamma\delta$ ⁺ phenotype and expansion of CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells should be tested for *CD3D* mutations.

Together, our results show that mature T cells made CD3 γ - or CD3 δ -deficient by KD did not recapitulate the corresponding congenital CD3 deficiencies in terms of surface TCR expression, suggesting that intrathymic pressures allow for plasticity of emerging lymphocytes with disparate surface TCR levels, both high (as in CD3 γ -deficient T cells) and low (as in CD3 δ -deficient $\gamma\delta$ T cells).

02 /

Resumen

02 / Resumen

INTRODUCCIÓN

El receptor de la célula T (TCR) es un receptor variable capaz de reconocer antígenos unidos a moléculas MHC. El TCR es un complejo multimérico formado por un heterodímero de cadenas variables (TCR α y TCR β o TCR γ y TCR δ) encargadas del reconocimiento antigénico y tres dímeros de cadenas invariantes (CD3 γ CD3 ϵ , CD3 δ CD3 ϵ y $\zeta\zeta$) encargadas de transducir la señal y estabilizar el complejo. La unión del TCR a complejos antígeno-MHC provoca la fosforilación de las tirosinas presentes en las porciones intracitoplásmicas de las cadenas invariantes, que a su vez desencadenan numerosas cascadas de señalización que tienen como resultado la activación del linfocito T y la elaboración de respuestas inmunológicas.

El ensamblaje del TCR es un proceso altamente controlado que comienza en el retículo endoplásmico (RE) y se completa en el aparato de Golgi donde el TCR hexamérico ($\alpha\beta\delta\epsilon\gamma\epsilon$) se asocia con el homodímero $\zeta\zeta$ para formar el receptor completo. Los receptores correctamente ensamblados se transportan a la membrana. Sin embargo, los TCR incompletos o mal plegados se retienen en el RE y finalmente se degradan en el citosol. Los TCR hexaméricos que alcanzan el aparato de Golgi pero que no incorporan el homodímero $\zeta\zeta$ son desviados en endosomas hacia los lisosomas para su degradación.

La deficiencia congénita de cualquiera de las cadenas invariables del TCR causa un grupo de inmunodeficiencias generalmente muy graves, aunque muy poco frecuentes, que afectan selectivamente al desarrollo de los linfocitos T. Estas inmunodeficiencias cursan casi siempre con infecciones que pueden ser letales en el primer año de vida si no se diagnostican y tratan mediante trasplante de médula ósea. Hasta la fecha se han descrito un total de 32 pacientes con mutaciones totales o parciales en alguna de las cadenas invariantes del TCR. Las deficiencias de CD3 δ y CD3 ϵ son las más severas y se caracterizan por una linfopenia T casi absoluta; mientras que las deficiencias de CD3 γ o ζ cursan con una linfopenia más leve. Además de las deficiencias completas, que son las más graves, se empiezan a describir cada vez más deficiencias parciales de las distintas cadenas con diverso grado de linfopenia y defecto de expresión del TCR, lo que aumenta la frecuencia y el rango de fenotipos clínico-inmunológicos (algunos sanos) y dificultan su diagnóstico certero y precoz.

CD3 γ y CD3 δ son proteínas con un elevado grado de homología; de hecho algunas especies de vertebrados expresan sólo una cadena CD3 γ/δ . Aún no se conoce con exactitud cuáles son las funciones individuales de las cadenas CD3 durante el ensamblaje y expresión del TCR y tampoco qué relaciones estequiométricas existen entre las subunidades que lo forman. Varios estudios han intentado abordar estas cuestiones valiéndose de ratones KO, pacientes deficientes para alguna de las cadenas, líneas celulares o sistemas heterólogos, pero estas estrategias han llevado, en algunos casos, a conclusiones contradictorias. En este trabajo proponemos una nueva aproximación para estudiar el papel de las cadenas CD3 γ y CD3 δ : silenciar mediante shRNA su expresión en linfocitos T maduros. Y además caracterizaremos el fenotipo de dos pacientes (AIII.1 y BII.2), que pertenecen a dos familias diferentes y que comparten una mutación *leaky* en *CD3D* (Gil *et al*, 2011), para establecer la necesidad de esta cadena en la selección y función de los linfocitos T.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar el papel de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en el ensamblaje, expresión y función del TCR, así como los requerimientos de estas dos cadenas para el desarrollo de las células T. Pese a la gran homología existente entre estas dos cadenas, la deficiencia de una o la otra en humanos tiene efectos clínicos muy dispares; además, los modelos murinos no recapitulan los efectos observados en humanos. En este trabajo nos hemos propuesto tratar de entender estas disparidades siguiendo dos estrategias: (i) silenciar la expresión de CD3 γ o CD3 δ (KD) y analizar el efecto sobre el ensamblaje, función y expresión del TCR; (ii) analizar el efecto de la deficiencia parcial de CD3 δ sobre la expresión y función del TCR y sobre el desarrollo T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio del ensamblaje y expresión del TCR en ausencia de CD3 γ o CD3 δ se generaron líneas KD (deficiencia inducida) utilizando shRNA específicos para estas dos cadenas. El análisis por WB de las líneas Jurkat shCD3 γ y shCD3 δ mostró una eficiencia de silenciamiento próxima al 100%. Se observó tanto por citometría de flujo como por microscopía, que la ausencia de CD3 γ o CD3 δ provocaba una pérdida de expresión del TCR en membrana. Estos resultados se confirmaron utilizando 5 secuencias shRNA diferentes específicas de CD3 γ o CD3 δ . Se observó que las distintas secuencias producían intensidades de silenciamiento diferentes y que éstas correlacionaban con la disminución de expresión del TCR en membrana. Nuestros resultados demuestran que CD3 γ y CD3 δ son imprescindibles para la expresión del TCR en membrana en la línea celular Jurkat. También se comprobó el efecto del KD en linfocitos primarios y en otras líneas celulares T. Los resultados obtenidos con estas células confirman los obtenidos en Jurkat: CD3 γ y CD3 δ son imprescindibles para la expresión del TCR en membrana.

En siguiente lugar se estudió el ensamblaje y maduración del TCR en las líneas KD. Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación se demostró que el ho-

modímero $\zeta\zeta$ no se asociaba con el resto de cadenas del TCR si faltaban CD3 γ o CD3 δ . Este último paso del ensamblaje tiene lugar en el aparato de Golgi y demostramos, tanto por microscopía de fluorescencia como analizando la maduración de los azúcares unidos a CD3 γ y CD3 δ , que las cadenas que forman el TCR no se exportaban al aparato de Golgi y por tanto quedaban retenidas en el RE. Nuestros resultados parecen indicar que los linfocitos T poseen un mecanismo para detectar y retener a los TCR deficientes en CD3 γ o CD3 δ .

Seguidamente se analizó el ensamblaje del TCR en el RE de las células KD. Se realizaron co-inmunoprecipitaciones de TCR β con las cadenas CD3, que mostraron que en ausencia de CD3 γ se formaban complejos tetraméricos con estequiometría $\alpha\beta\delta\epsilon$. Sin embargo, cuando se silenciaba la cadena CD3 δ se ensamblaban complejos hexaméricos con estequiometría $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$. Por tanto, nuestros resultados indican que la cadena TCR α es más promiscua que TCR β , en lo que a unión de dímeros CD3 se refiere, y que el ensamblaje del TCR puede comenzar tanto con la unión del dímero CD3 $\gamma\epsilon$ como con CD3 $\delta\epsilon$. Estas dos observaciones contradicen los modelos previos generados en células no T, que postulaban que TCR β era la cadena TCR con mayor promiscuidad y que la unión de CD3 $\delta\epsilon$ era obligatoriamente el primer paso en el ensamblaje. En cuanto a por qué quedan retenidos estos TCR en el RE de las células KD, proponemos 2 posibles explicaciones, bien las señales de retención en el RE presentes en todas las cadenas no quedan anuladas en estos TCR o bien alguna chaperona podría estar impidiendo la salida de estos complejos del RE.

El estudio de las líneas KD para CD3 γ o CD3 δ parece indicar que estas dos cadenas tienen funciones no redundantes ya que ambas son necesarias para la expresión del TCR en membrana. Esto concuerda con lo observado en la línea Jurkat Gamma Negativa (JGN) y con los experimentos realizados en células no T. Por el contrario, nuestros datos son difíciles de reconciliar con la expresión de un TCR sin CD3 γ en los pacientes deficientes para esta cadena y sugieren que estos TCR, o las células que los portan, son fruto de las presiones selectivas durante el desarrollo tímico (Garcillán *et al*, en preparación).

En la segunda parte de la tesis se han caracterizado 2 pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ (Gil *et al*, 2011 and Garcillán *et al*, 2014). Ambos portaban una mutación en *CD3D* que provocaba un splicing alternativo con pérdida del exón 2 en el 90% de los casos, pero que permitía un procesamiento correcto en un 10% de los casos; la mutación causaba una disminución del 50% en los niveles de CD3 δ intracelular. Como consecuencia, los pacientes presentaban características de SCID T⁻B⁺NK⁺ y necesitaron trasplante de progenitores hematopoyéticos.

El estudio inmunológico de los pacientes mostró una disminución en el número de linfocitos T $\alpha\beta$, que además eran oligoclonales, y números normales de linfocitos T $\gamma\delta$ con un repertorio bastante policlonal. Contradictoriamente, la expresión del TCR estaba más reducida en los linfocitos T $\gamma\delta$ (90% de reducción) que en los $\alpha\beta$ (50%); esta discrepancia entre los dos linajes no se debía a efectos

diferenciales de la mutación en un linaje o en otro, ya que mediante citometría intracelular mostramos que la reducción en los niveles de CD3 δ intracelular era similar en linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Además, el silenciamiento de CD3 δ en linfocitos T de individuos sanos, demostró que la discrepancia entre los niveles de expresión del TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ no se debía a efectos bioquímicos, ya que el KD causaba una pérdida de expresión del TCR similar en los dos tipos celulares. Las diferencias observadas más bien parecen indicar que existe una diferente dependencia en los niveles de TCR para la selección tímica de los linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. En el caso del linaje $\alpha\beta$, la selección tímica seleccionaría preferentemente aquellas células con mayores niveles de expresión del TCR, mientras que las células $\gamma\delta$ se seleccionarían sin importar tanto los niveles de expresión del TCR y por tanto permitiendo la selección de linfocitos T $\gamma\delta$ con bajos niveles de expresión del TCR. De hecho, observamos que la distribución de los niveles de TCR en individuos normales era significativamente más heterogénea en linfocitos T $\gamma\delta$ que en $\alpha\beta$, sugiriendo un control menos estricto en los niveles de TCR para las primeras.

Los linfocitos T $\alpha\beta$ de los pacientes mostraron menor inducción de eventos tempranos (CD69 y CD25) tras activación a través del TCR, sin embargo, los linfocitos T $\gamma\delta$ respondían normalmente pese al mayor defecto de expresión del TCR. Sin embargo, la internalización del TCR tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 era normal en ambos linajes, aunque la cinética de reexpresión del TCR estaba ligeramente retrasada.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺ son extremadamente infrecuentes en individuos normales (<1%), sin embargo en los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ , estas células constituían el 15-30% de los linfocitos T $\gamma\delta$. La expresión de CD4 por parte de estas células era estable y no se debía a una expresión transitoria por parte de las CD4⁻, ya que tras varios días en cultivo se mantenía. Tampoco eran el resultado de una expansión clonal porque expresaban cadenas TCR diversas. Pese a que estas células son muy infrecuentes, se han descrito linfomas, y expansiones locales en pacientes asmáticos, y se han correlacionado con fenotipos Th2. También se han descrito expansiones de estas células en varios modelos murinos, que tienen en común las características tipo Th2 y los bajos números de linfocitos T $\alpha\beta$; de hecho, el paciente AIII.1 mostraba niveles elevados de IgE, al igual que los ratones con expansiones de estas células. El aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺ en los pacientes no era consecuencia de la linfopenia T $\alpha\beta$, ya que pacientes con mutaciones en TCR α no presentan esta expansión; más bien parece que el aumento se deba al defecto de expresión del TCR $\gamma\delta$, de modo que las señales necesarias para la selección negativa de estas células estuviesen debilitadas, favoreciéndose su supervivencia y, por ende, su aumento en periferia. Sin embargo, esta expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺ no se ha observado en otras deficiencias de cadenas del TCR (CD3 γ o ζ), que también causan bajada en los niveles de expresión del TCR. Por tanto los linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺ parecen ser exclusivos de la deficiencia parcial de CD3 δ , y por tanto, la detección de estas células podría tener utilidad diagnóstica.

CONCLUSIONES

El análisis de las líneas KD para CD3 γ y CD3 δ demuestra que estas dos cadenas son necesarias para la salida del TCR del RE y su expresión en membrana en linfocitos T maduros. Además, no se han observado isoformas del TCR carentes de CD3 γ o CD3 δ en este escenario post-tímico, a diferencia de lo observado en linfocitos T de pacientes deficientes en CD3 γ . Con respecto al ensamblaje, nuestros datos apuntan a que éste podría empezar tanto con la interacción TCR α -CD3 $\delta\epsilon$ como con TCR β -CD3 $\gamma\epsilon$, y además parecen indicar que la cadena TCR α es más promiscua que TCR β para la unión de dímeros CD3.

La deficiencia congénita parcial de CD3 δ causa una disminución en los niveles de expresión del TCR en membrana, que afecta más a la expresión del TCR $\gamma\delta$ que a la del $\alpha\beta$; sin embargo, la señalización vía TCR $\alpha\beta$, pero no la $\gamma\delta$, estaba reducida. Además, nuestros resultados indican que los linfocitos T $\gamma\delta$ de los pacientes dependen menos de la expresión del TCR para su desarrollo en el timo que los $\alpha\beta$, ya que los números de linfocitos T $\gamma\delta$ eran normales mientras que los de $\alpha\beta$ estaban muy reducidos. Esta deficiencia se asocia además, con un aumento de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺, que son específicos de esta inmunodeficiencia y que por tanto podrían tener interés diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- **Garcillán B.**, Mazariegos M. S., Jiménez-Reinoso A., Marín A. V. M., Muñoz-Ruiz M. and Regueiro J. R. CD3 γ and CD3 δ are required for surface TCR expression on mature T cells (in preparation, 2014)
- **Garcillán B.**, Mazariegos M. S., Fisch P., Res P. C., Muñoz-Ruiz M., Gil J., López-Granados E., Fernández-Malavé E. and Regueiro J. R. Enrichment of the rare CD4⁺ $\gamma\delta$ T-cell subset in patients with atypical CD3 δ deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 (Epub ahead of print 2013/12/03). IF: 12,0
- Gil J., Busto E. M., **Garcillán B.**, Chean C., Garcia-Rodriguez M. C., Diaz-Alderete A., Navarro J., Reine J., Mencia A., Gurbindo D., Belendez C., Gordillo I., Duchniewicz M., Hohne K., Garcia-Sanchez F., Fernández-Cruz E., López-Granados E., Schamel W. W., Moreno-Pelayo M. A., Recio M. J. and Regueiro J. R. A leaky mutation in CD3D differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ +B+NK⁺ human SCID. *J Clin Invest.* 2011; 121 (10):3872-6. IF: 15,4

03 /

Summary

03 / Summary

INTRODUCTION

T lymphocytes detect the presence of antigens through a cell surface complex termed the TCR. This receptor is composed of a variable heterodimer (either TCR $\alpha\beta$ or TCR $\gamma\delta$) responsible for ligand recognition and 3 invariant dimers (CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ and $\zeta\zeta$) that participate in assembly and surface expression of the TCR complex and in the delivery of intracellular signals. Binding of the peptide–MHC complex by the TCR results in the phosphorylation of tyrosine residues within the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) of the cytoplasmic tails of the CD3 and ζ chains and eventually leads to the activation of several signaling cascades that result in T cell activation and the elaboration of the cellular immune response.

TCR assembly is an ordered process that begins in the endoplasmic reticulum (ER). CD3 heterodimers are formed through interactions between their extracellular Ig domains and they associate with TCR chains through intramembrane contacts to form the hexameric TCR ($\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon$), which is exported to the Golgi apparatus where it interacts with the $\zeta\zeta$ homodimer. The result is an octameric complex which is sorted to the plasma membrane. Correct folding and assembly is required for transport to the cell surface, misfolded or single subunits and partial receptor complexes are retained in the ER and eventually retro-translocated to the cytosol for ER-associated degradation (ERAD). Hexameric TCR that reach the Golgi apparatus but fail to assemble with $\zeta\zeta$ are sorted to the lysosomal pathway for degradation.

Mutations in any of the genes encoding for the invariant chains selectively impair T cell development. Unless hematopoietic stem cells are replaced, such mutations frequently cause early-onset SCID and death. To date, 32 patients with mutations in invariant chains have been reported, including partial mutations that allow for expression of some normal proteins. Complete CD3 δ and CD3 ϵ deficiency are the most severe of these conditions, with no T cells in venous blood. In contrast, CD3 γ and ζ deficiencies and partial deficiencies of CD3 δ or CD3 ϵ allow the selection of reduced numbers of T cells, which show poor surface TCR expression.

CD3 γ and CD3 δ proteins are highly homologous; in fact, some vertebrates have a single CD3 γ/δ chain. The functions of the individual CD3 chains for assembly

and expression and the structural relationships among the subunits of the TCR complex are still not fully known, and differ between humans and mice. Several studies have attempted to address these questions studying KO mice, immunodeficient patients, mutant cell lines or heterologous systems, but in some cases they yielded contradictory results. In this thesis we propose a new approach to explore the roles of CD3 γ and CD3 δ : to knock down their expression in mature T lymphocytes. We also characterize two patients termed AIII.1 and BII.2 belonging to two different families who shared a leaky *CD3D* mutation (Gil *et al*, 2011) to establish the dependence on this chain for TCR expression and function, and T cell selection and function.

OBJECTIVES

The general aim of this work is to establish the biological role of CD3 γ and CD3 δ in TCR assembly, surface expression and function and the minimum requirements for T cell development. Despite the high homology between CD3 γ and CD3 δ , the clinical features of their deficiencies are very different. Moreover, mice model do not resemble the effects observed in humans. The objective of this work is to unravel these disparities following two different strategies: (i) knock down CD3 γ and CD3 δ to analyze their role in TCR assembly, processing and expression; (ii) characterize the impact of human partial CD3 δ deficiency on TCR expression and function and on $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell development.

RESULTS AND DISCUSSION

CD3 γ or CD3 δ KD T cell lines were generated using shRNA. Western blot analysis demonstrated the almost complete and selective absence of CD3 γ or CD3 δ proteins in Jurkat cells treated with shRNA for CD3 γ (shCD3 γ) or CD3 δ (shCD3 δ), respectively, as compared with Non-Target shRNA (shNT). The absence of CD3 γ or CD3 δ caused a loss of surface TCR expression as revealed by flow cytometry analysis with a broad panel of mAb against the TCR/CD3 complex and by fluorescence microscopy. To confirm these results, we tested the effect of 5 different shRNA sequences against CD3 γ or CD3 δ on surface TCR expression; the effect of these shRNA correlate with the KD they produced and thus confirmed that the effects we observed were specific. These observations conclusively demonstrated a critical requirement of CD3 γ and CD3 δ for TCR cell surface expression in the Jurkat T cell line. Surface TCR expression after KD was also analyzed in primary T cells and T cell lines other than Jurkat. The results were similar to Jurkat T cells, further supporting that CD3 γ and CD3 δ are necessary for TCR surface expression.

Next, characterization of the biosynthesis and assembly of the TCR was undertaken. Co-immunoprecipitation analysis of TCR components demonstrated that the ζ chain was not associated with TCR β or CD3 ϵ in KD cells. Maturation of CD3 γ and CD3 δ was studied in Jurkat shNT cells: a fraction of these proteins became endoglycosidase H (EndoH) resistant due to processing of oligosaccha-

ride side chains in the Golgi apparatus. In contrast, almost 100% of CD3 γ in shCD3 δ and CD3 δ in shCD3 γ remained EndoH sensitive, indicating that these chains were not transported from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus for subsequent oligosaccharide processing in KD cells. These results were supported by fluorescence microscopy localization of TCR β and ζ proteins in KD cells. The results indicated that TCR hexamers and $\zeta\zeta$ homodimers colocalize in control Jurkat T cells (shNT); in contrast, in the absence of CD3 γ or CD3 δ , partial TCR complexes stayed in the ER and did not colocalize with $\zeta\zeta$ homodimers. As it has been shown previously, ζ association with the TCR takes place in the Golgi apparatus, so we conclude that the TCR complexes in KD cells are retained actively in the ER. Thus, we have obtained direct evidence confirming that in the absence of CD3 γ or CD3 δ , partial TCR ensembles do not egress from the ER. It seems that T cells have an active mechanism, which detects and retains or does not allow transport of CD3 γ - and CD3 δ -deficient TCR complexes.

We next analyzed the assembly of the hexameric TCR in the ER of KD cells. The results showed that in the absence of CD3 γ tetrameric $\alpha\beta\delta\epsilon$ complexes were formed. In contrast, in the absence of CD3 δ , hexameric TCR were assembled with an aberrant stoichiometry consisting on $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$. Thus, our results do not fit with the current model which postulated that the incorporation of $\delta\epsilon$ was the first step in TCR assembly and was necessary for the incorporation of the $\gamma\epsilon$ dimer. We propose that ER retention signals or/and an undefined ER-retention molecule control the egress of TCR complexes from the ER in KD cells.

Taken together, our data support the concept of non-redundant roles of CD3 γ and CD3 δ , as they are both needed for surface TCR expression. This is in agreement with results of others in Jurkat Gamma Negative cells and with experiments in non T cells. However, our results are difficult to reconcile with the observation of surface CD3 γ -less TCR in human congenital CD3 γ deficiency, unless intra-thymic selection pressures are involved (Garcillán *et al*, in preparation).

On the second part of this thesis we characterized 2 patients with partial CD3 δ deficiency (Gil *et al*, 2011 and Garcillán *et al*, 2014). Both patients shared a splicing mutation in *CD3D* (c.274+5G>A) which strongly impaired, but did not abrogate, *CD3D* splicing, and allowed for 50% normal CD3 δ protein expression. As a consequence, they showed early-onset SCID with T⁻B⁺NK⁺ phenotype and they both received haploidentical CD34⁺ peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation.

Both patients showed strongly reduced numbers of peripheral $\alpha\beta$ T cells (around 10 times less than age-matched healthy donors) but normal counts of $\gamma\delta$ T cells. Moreover, *TCRB* clonality and *TCRD* spectratyping revealed an oligoclonal TCRV β repertoire but a fairly polyclonal repertoire of $\gamma\delta$ T cells. Counterintuitively, TCR expression was more reduced in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ T cells from the patients. Extracellular flow cytometry analysis revealed that surface $\gamma\delta$ TCR ex-

pression was 10-fold less than controls, while surface $\alpha\beta$ TCR was only 2-3-fold lower. This discrepancy in surface TCR levels was not due to differences in CD3 δ chain availability in each cell subset, as $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells from the patients had a similar reduction in intracellular CD3 δ (around 2-fold) relative to controls. Furthermore, the observed discrepancy was not due to a selective biochemical effect of partial CD3 δ deficiency on surface $\gamma\delta$, but not $\alpha\beta$, TCR expression, because CD3 δ KD in normal mature primary T cells caused a comparable drop (25-30%) in surface TCR of both lineages. Thus, partial CD3 δ deficiency does not *per se* impair surface $\gamma\delta$ more than surface $\alpha\beta$ TCR expression. Rather, the observed differences may be due to the differential dependence on surface TCR levels for the intrathymic selection of each lineage, which would be more permissive for $\gamma\delta$ but stricter for $\alpha\beta$ T cells. This would allow for the selection of normal numbers of $\gamma\delta$ T cells with very low levels of surface TCR and low numbers of $\alpha\beta$ T cells with higher levels of surface TCR. Indeed, we observed that surface TCR levels in normal individuals were significantly more heterogeneous in $\gamma\delta$ as compared with $\alpha\beta$ T cells, suggesting a lighter control of TCR levels in the former cell type.

$\alpha\beta$ T cells from the patients showed strongly reduced induction of early activation markers (CD69 or CD25) after TCR engagement. In contrast, $\gamma\delta$ T cells responded normally despite their strongly reduced surface TCR expression. TCR internalization after stimulation with anti-CD3 mAb was normal in both lineages, whereas TCR re-expression was slightly delayed.

CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells are extremely rare in normal individuals (<1% of $\gamma\delta$ T cells), but surprisingly they were strongly enriched in the patients (around 10-fold). Upon long-term culture, they retained surface CD4, indicating that they were not a result of CD4 upregulation in the CD4⁻ subset. Moreover, they were not a clonal expansion, since they showed a low but diverse surface TCR, as demonstrated by the detection of V δ 1⁺, V δ 2⁺ and V γ 9⁺ cells. CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells are normally very rare, although lymphomas and local expansions have been reported in humans and were shown to correlate with Th2 phenotypes. In mice, expansion of CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells has been observed in several mutant models, which shared Th2 features and low numbers of $\alpha\beta$ T cells. Of note, one patient (AIII.1) showed abnormally high IgE levels (patient BII.2 could not be studied due to his protein-losing enteropathy), as observed in mutant mice with expanded CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells.

Enrichment of the CD4⁺ $\gamma\delta$ T cell subset in partial CD3 δ deficient patients was not a consequence of their $\alpha\beta$ T cell lymphopenia, as $\alpha\beta$ lymphopenic patients due to mutations in TCR α showed no such expansion. Rather, it was likely caused by reduced TCR expression and/or function. However, this was not the case in humans with other TCR defects (complete deficiency in CD3 γ or ζ chain). These results could be of some diagnostic relevance to identify the molecular basis of primary immunodeficiencies: patients with high CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells should be tested for *CD3D* mutations.

CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells in the patients, and in mice models with expansions of these cells, showed a constitutively activated phenotype in comparison with CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells, as judged by CD69 and CD25 expression.

In conclusion, our data suggest that CD4⁺CD8⁻, CD8⁺ and CD4⁺ cells may be developmentally independent $\gamma\delta$ T cell lineages and that TCR expression and function plays an important role in modulating the development of the CD4⁺ $\gamma\delta$ subset. Our findings are consistent with a scenario in which CD4⁺ and CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells would develop without a requirement for positive selection. However, CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells could be the target of negative selection. Impaired TCR $\gamma\delta$ expression or function in these cells could thus weaken TCR signals necessary for their negative selection, ultimately leading to their enhanced development and overrepresentation in the patients.

CONCLUSIONS

The analysis of CD3 γ or CD3 δ KD T cells demonstrates that both CD3 γ and CD3 δ are required for TCR association to ζ , egress from the ER into the Golgi for proper glycosylation and surface expression. Thus, in these KD T cells TCR signalling could not be studied, and surface TCR isoforms lacking CD3 γ (or CD3 δ) were not observed, in contrast to our previous findings in primary T cells from congenital CD3 γ deficiencies. Also, both TCR α -CD3 $\delta\epsilon$ and TCR β -CD3 $\gamma\epsilon$ interactions were shown to be possible as a first step for TCR assembly, not only the former as described in B cell microsomes. Lastly, TCR α was shown to be more promiscuous than TCR β , as it was found to bind not only CD3 $\delta\epsilon$ but also CD3 $\gamma\epsilon$ dimers.

From the study of the congenital partial CD3 δ deficiency we conclude that the deficiency caused a stronger (10-fold) impact in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ (2-fold) TCR surface expression, whereas CD3 δ KD had a similar impact on surface TCR expression by $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ primary T cells. Unexpectedly, signaling was shown to be impaired via the $\alpha\beta$, but not the $\gamma\delta$, TCR. Peripheral blood $\gamma\delta$ T cell numbers were normal whereas $\alpha\beta$ T cells were strongly reduced, suggesting that human $\gamma\delta$ T cells are less dependent on TCR expression than $\alpha\beta$ T cells for development in the thymus. Lastly, a unique abnormal expansion of activated polyclonal CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells was ascertained, which could be of diagnostic interest for patients with T $\alpha\beta$ ⁻T $\gamma\delta$ ⁺ phenotype.

Together, our results show that post-thymic mature T cells made CD3 γ - or CD3 δ -deficient by KD did not recapitulate the corresponding congenital CD3 deficiencies in terms of surface TCR expression, suggesting that intrathymic pressures allow for plasticity of emerging lymphocytes with disparate surface TCR levels, both high (as in CD3 γ -deficient T cells) and low (as in CD3 δ -deficient $\gamma\delta$ T cells).

BIBLIOGRAPHY

• **Garcillán B.**, Mazariegos M. S., Jiménez-Reinoso A., Marín A. V. M., Muñoz-Ruiz M. and Regueiro J. R. CD3 γ and CD3 δ are required for surface TCR expression on mature T cells (in preparation, 2014)

• **Garcillán B.**, Mazariegos M. S., Fisch P., Res P. C., Muñoz-Ruiz M., Gil J., López-Granados E., Fernández-Malavé E. and Regueiro J. R. Enrichment of the rare CD4+ $\gamma\delta$ T-cell subset in patients with atypical CD3 δ deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 (Epub ahead of print 2013/12/03). IF: 12,0

• Gil J., Busto E. M., **Garcillán B.**, Chean C., Garcia-Rodriguez M. C., Diaz-Alderete A., Navarro J., Reine J., Mencia A., Gurbindo D., Belendez C., Gordillo I., Duchniewicz M., Hohne K., Garcia-Sanchez F., Fernández-Cruz E., López-Granados E., Schamel W. W., Moreno-Pelayo M. A., Recio M. J. and Regueiro J. R. A leaky mutation in CD3D differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ +B+NK+ human SCID. *J Clin Invest.* 2011; 121 (10):3872-6. IF: 15,4

04 /

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
aa	Aminoácido
AF	Alexa Flúor
BiP	<i>Immunoglobulin heavy chain-binding protein</i> (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulinas)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albúmina de suero bovino)
CD	<i>Cluster</i> de Diferenciación
CF	Citometría de Flujo
CMV	Citomegalovirus
DEPC	Dietilpirocarbonato
DN	Doble Negativo (timocito CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	Doble Positivo (timocito CD4 ⁺ CD8 ⁺)
EC	Extracelular
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (quimioluminiscencia mejorada)
EndoH	Endoglicosidasa H
EPCR	<i>Endothelial Protein C Receptor</i> (receptor endotelial de la proteína C)
Erk	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i> (quinasa del receptor extracelular activado)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (suero bovino fetal)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
Gy	Grey
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antígeno leucocitario humano)
HMB-PP	(E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato
HVS	<i>Herpes Virus Saimiri</i>
IC	Intracelular
ID	Inmunodeficiencia
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Inmunoprecipitación
IPP	<i>Isopentenyl pyrophosphate</i> (pirofosfato de isopentenilo)
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i> (motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosinas)
KD	<i>Knock Down</i> (atenuación génica)
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knock Out</i> (desactivación génica)
LAT	<i>Linker for Activation of T cells</i> (nexo de activación de los linfocitos T)
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (caldo de lisogenia)
Lck	Proteína tirosina quinasa específica de leucocitos
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i> (repeticiones largas terminales características para la inserción retroviral)
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i> (anticuerpo monoclonal)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteínas quinasas activadas por mitógenos)
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (intensidad media de fluorescencia)

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (complejo principal de histocompatibilidad)
MICA	<i>MHC class I related molecule A</i> (molécula relacionada con MHC de clase I A)
MICB	<i>MHC class I related molecule B</i> (molécula relacionada con MHC de clase I B)
min	Minuto
mRNA	RNA mensajero
NF-κB	Nuclear Factor-κB (factor nuclear κB)
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> (factor nuclear de linfocitos T activados)
NK	<i>Natural Killer</i> (linfocito citolítico natural)
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en geles de poliacrilamida)
PBL	<i>Peripheral Blood Lymphocyte</i> (linfocito de sangre periférica)
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (célula mononuclear de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Ficoeritrina-cianina 5
PFA	Paraformaldehído
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinasa)
PKC	<i>Protein kinase C</i> (proteína quinasa C)
PLCγ1	<i>Phospholipase Cγ1</i> (fosfolipasa Cγ1)
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i> (fluoruro de polivinilideno)
RAG	<i>Recombination Activating Gene</i> (gen activador de la recombinación)
RE	Reticulo Endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
SCID	<i>Severe Combined ID</i> (ID combinada severa)
SD	<i>Standard Deviation</i> (desviación estándar)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida)
s	Segundo
Ser	Serina
SH	<i>Src Homology domain</i> (dominio de homología Src)
SLP76	<i>SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i> (proteína leucocitaria de 76 kDa de unión a SH2)
SP	Simple positivo (timocito CD4 ⁺ CD8 ⁻ o CD8 ⁺ CD4 ⁻)
TA	Temperatura Ambiente
Tc	Linfocito T citotóxico
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de la célula T)
Th	Linfocito T <i>helper</i> (cooperador)
TM	Transmembrana
Treg	Linfocito T regulador
TRITC	Isocianato de Tetrametil Rodamina
Tyr	Tirosina
UI	Unidades Internacionales
vs	<i>versus</i>
VSV-G	<i>Protein G from Vesicular Stomatitis Virus</i> (Proteína G del virus de la estomatitis vesicular)
WB	Western Blot
ZAP-70	<i>Zeta-chain Associated Protein kinase 70</i> (Proteína asociada a ζ de 70kDa)

05 /

Introducción

1. Linfocitos T

Los linfocitos B y T se caracterizan por poseer receptores variables (inmunoglobulinas y TCR respectivamente) generados por recombinación de segmentos génicos V(D)J y con la capacidad de reconocer antígenos. Estos dos tipos de receptores están presentes en todos los vertebrados mandibulados y se cree que provienen de un receptor ancestral común (1). Los linfocitos T tienen un papel central en la inmunidad adaptativa, ya que tienen la capacidad de actuar sobre células infectadas o dañadas, así como de modular la actividad de otras células.

Existen dos grupos de linfocitos T según el isotipo de TCR que expresen en su membrana, los linfocitos $T\alpha\beta$, que expresan $TCR\alpha\beta$ y los $T\gamma\delta$ que expresan $TCR\gamma\delta$.

1.1. LINFOCITOS $T\alpha\beta$

Los linfocitos $T\alpha\beta$ son los más abundantes en humanos, 90-95% de los linfocitos T de sangre periférica. A su vez se pueden subdividir en dos linajes, el linaje CD4 (Th, cooperadoras o *helper*) y el CD8 (Tc, citotóxicas). Los linfocitos Th actúan como coordinadores de la respuesta inmunitaria, controlando la acción de otros linfocitos y células del sistema inmunitario, mientras que los linfocitos Tc son responsables, entre otras funciones, de la destrucción de células infectadas y células dañadas (2). Además de estos dos grandes linajes existen otros menos abundantes como son las células DN y los linfocitos NKT (linfocitos $T\alpha\beta$ que además expresan marcadores típicos de células NK).

1.2. LINFOCITOS $T\gamma\delta$

Los linfocitos $T\gamma\delta$ son minoritarios en humanos, 5-10% de los linfocitos T de sangre periférica, aun-

que en otros mamíferos como la oveja, constituyen aproximadamente el 30%. A diferencia de los linfocitos $T\alpha\beta$, las propiedades y funciones de los linfocitos $T\gamma\delta$ no son tan bien conocidas.

La mayoría de las células $\gamma\delta$ son DN (>70%), algunas expresan CD8 (30% aprox.) y unas pocas CD4 (<1%); también suelen expresar receptores típicos de células NK, como CD56, NKG2D, NKP30 o CD161 y de hecho comparten algunas de sus funciones con estas células. Algunos linfocitos $T\gamma\delta$, al igual que los NK, reconocen células infectadas por virus, estresadas o transformadas y tienen capacidad citolítica. Pero además, las células $\gamma\delta$ expresan el receptor de antígeno $TCR\gamma\delta$, lo que les confiere memoria, capacidad de expandirse rápidamente y organizar respuestas muy rápidas tras la reinfección con un patógeno determinado. Por todo esto se considera que las células $\gamma\delta$ constituyen un nexo entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (3, 4). Así mismo también se ha demostrado que estas células pueden adquirir el papel de células presentadoras de antígeno profesionales (5). En resumen, las células $\gamma\delta$ se podrían describir como una población de linfocitos T no clásicos que poseen gran versatilidad.

En ratón, existen varias subpoblaciones de células $\gamma\delta$ según las cadenas variables $TCR\gamma$ y $TCR\delta$ que expresen; durante el desarrollo éstas se dirigen a un nicho determinado, generalmente epitelios y mucosas de diferentes órganos. Sin embargo, esta correlación entre TCR y localización no se ha encontrado en humanos, donde se suele dividir a las células $\gamma\delta$ en dos subpoblaciones, las que expresan $TCR\delta$ con regiones variables $V\delta 2$ y las no- $V\delta 2$ (3).

En humanos adultos, el 65-90% de los linfocitos $\gamma\delta$ de sangre periférica, expresan la cadena V δ 2 (generalmente asociada con cadenas TCR γ V γ 9). Estas células V δ 2V γ 9 existen sólo en primates y su función principal es el reconocimiento de fosfoantígenos no peptídicos (pAg) a través de su TCR. Se ha demostrado que las células infectadas, estresadas o transformadas producen pAg como IPP y ciertos microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* o parásitos como la malaria también producen pAg derivados de la ruta de síntesis de los isoprenoides, como HMB-PP. De hecho, estas células se activan y proliferan muy activamente durante infecciones por microorganismos que producen este pAg (6). Es interesante destacar que HMB-PP es unas 1000 veces más potente en la activación de linfocitos V δ 2V γ 9 *in vitro* que IPP. En resumen, las células V δ -2V γ 9 se han especializado en el reconocimiento de pAg y gracias a ello son capaces de reconocer células estresadas o responder a infecciones (7).

La otra subpoblación de células $\gamma\delta$ suele denominarse “no-V δ 2”; en su mayoría expresan la cadena V δ 1 y en menor medida V δ 3 y V δ 5. La mayor parte de células $\gamma\delta$ asociadas a tejidos en humanos pertenecen al linaje no-V δ 2 y, a diferencia del ratón, su preferencia por ciertas cadenas V γ es menos estricta. Su función es mantener la homeostasis en los microambientes a los que están asociadas y además participan en la eliminación de células estresadas o transformadas. En el tracto gastrointestinal intervienen en la tolerancia a antígenos de alimentos y flora intestinal y durante el embarazo se acumulan en la placenta, donde seguramente jueguen un papel importante en la tolerancia a los antígenos paternos del feto. Los ligandos de las células no-V δ 2 no se conocen con exactitud, aunque diversos estudios han demostrado el reconocimiento a través de su TCR de las moléculas MICA, MICB, CD1c y EPCR (3).

En conclusión, aunque la función de las células $\gamma\delta$ no se conoce tan detalladamente como la de las células $\alpha\beta$, se cree que las células $\gamma\delta$ se encargan de reconocer células propias estresadas, responder a infecciones causadas por ciertos patógenos e inducir tolerancia a antígenos no propios que no son dañinos (8).

2. Maduración de los linfocitos T en el timo

Los progenitores de los linfocitos T se originan en la médula ósea y el hígado fetal, de allí pasan al torrente sanguíneo desde donde colonizan el timo, el órgano donde se diferenciarán y madurarán. En el timo, los precursores de los linfocitos T pasan por distintos estadios madurativos que pueden distinguirse por la expresión de determinadas proteínas en su membrana (TCR, CD4, CD8, CD25, CD44...). Además, durante la maduración tímica se generan los distintos tipos de linfocitos T y se seleccionan las células potencialmente útiles y eliminan las potencialmente dañinas.

Cuando los precursores de los linfocitos T entran en el timo no expresan los correceptores CD4 y CD8 (timocitos DN). Los timocitos DN migran hacia la corteza tímica, donde pasan por distintos estadios madurativos (DN1, DN2 y DN3), y es en estos estadios cuando comienzan a reordenarse los genes *Tcr* γ , δ y β (gracias a la expresión de los genes *RAG1* y *RAG2*) y cuando se comprometen hacia el linaje T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (9).

2.1. DECISIÓN DE LINAJE

Los linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$ se desarrollan en el timo a partir de un progenitor común; el mecanismo por el que se genera uno u otro linaje no está claramente definido. Existen diversos modelos que intentan explicar cómo ese progenitor común se compromete hacia el linaje T $\alpha\beta$ o hacia el T $\gamma\delta$. El **modelo instructivo** postula que esta decisión depende del isotipo de TCR que se reordene correctamente, si existe un reordenamiento productivo del pre-TCR (pT $\alpha\beta$) la célula se dirigirá hacia el linaje T $\alpha\beta$, y si es el TCR $\gamma\delta$ hacia T $\gamma\delta$ (10). Sin embargo, el **modelo selectivo** o estocástico afirma que la decisión se toma en estadios anteriores, previos a la expresión del TCR (11).

Estos dos modelos no explican numerosas evidencias observadas en ratones transgénicos, y es por eso que en los últimos años ha surgido otro modelo, el **modelo de intensidad de la señal** (fig. 11). En este modelo el factor determinante es la intensidad de la

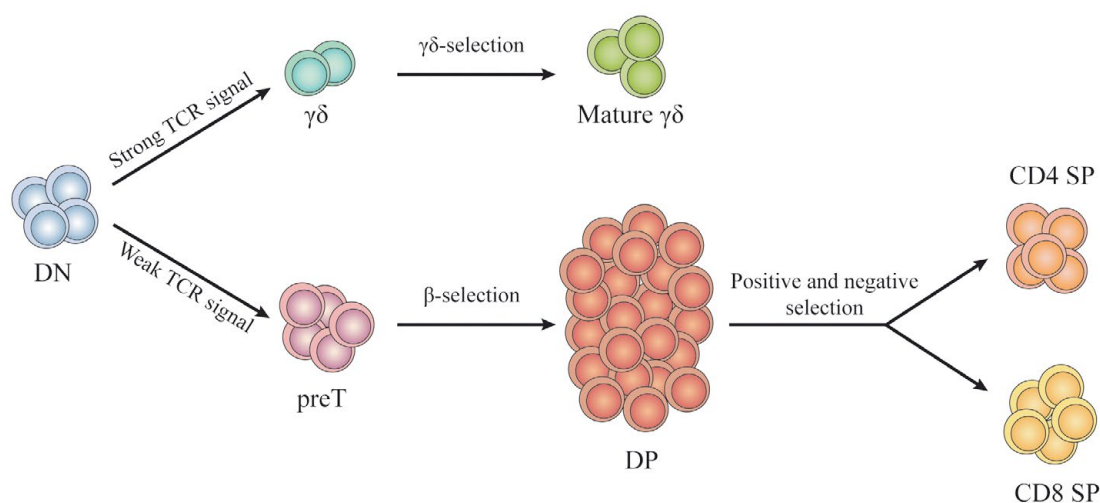


Figure 11: Development of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes in the thymus. $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ lineage divergence step takes place at the double-negative (DN) stage. Main TCR-mediated checkpoints are indicated for both lineages. Adapted from Ciofani et al 2010.

señal transmitida por el TCR, donde señales débiles favorecerán la diferenciación hacia $T\alpha\beta$ y fuertes hacia $T\gamma\delta$, indistintamente del TCR que exprese la célula (12-15).

2.2. SELECCIÓN

Tras la decisión de linaje, las células T prosiguen su maduración, pero además se seleccionan las células útiles y eliminan las potencialmente dañinas.

2.2.1. Linfocitos $T\alpha\beta$

El primer paso en la selección de los linfocitos $T\alpha\beta$ es la **selección β** . Los linfocitos $T\alpha\beta$ reordenan en primer lugar *Tcr β* ; si este reordenamiento es productivo, expresarán la cadena β junto a la cadena invariante pT α (pre-TCR). La señalización a través del pre-TCR es independiente de ligando y evita la muerte celular programada del timocito, además induce una proliferación intensa del timocito. Tras la selección β , los timocitos modulan la expresión de CD25, expresan en su membrana CD4 y CD8 (timocitos DP) y comienzan a reordenar *Tcr α* . Los timocitos DP son la población mayoritaria en el timo (alrededor del 80%) y los primeros en expresar el TCR $\alpha\beta$.

El heterodímero $\alpha\beta$ ha de ser capaz de reconocer moléculas MHC propias (clase I o II) presentes en las células epiteliales de la corteza tímica (cTEC) para poder sobrevivir. Los timocitos cuyo TCR no reconozca moléculas MHC se eliminarán por muerte celular programada, mientras que el resto seguirá el proceso de maduración, inhibiendo la expresión de los genes *RAG* y migrando hacia la médula del timo. Este proceso en el que se seleccionan timocitos que porten TCR restringidos por MHC recibe el nombre de **selección positiva** (9, 16).

Para evitar el desarrollo de células T autorreactivas, los timocitos que reconozcan pMHC con alta afinidad serán eliminados por apoptosis en un proceso de delección clonal o **selección negativa** inducido por la señalización a través del TCR. Este proceso es esencial para la tolerancia central y depende de la expresión (dependiente del factor de transcripción AIRE) de diversos antígenos específicos de teji-

dos en las células epiteliales de la médula del timo (mTEC) y células dendríticas (DC) (17).

Tras los procesos de selección positiva y negativa, sólo aquellos timocitos con TCR funcionales pero no autorreactivos sobrevivirán (menos del 5% de los timocitos) y dejarán de expresar uno de los correceptores (fig.11). La especificidad del TCR por MHC clase I o clase II determinará que el timocito madure hacia linfocito CD4 o CD8 (SP), los timocitos SP saldrán del timo hacia el torrente sanguíneo como linfocitos T maduros (16, 18).

2.2.2. Linfocitos $T\gamma\delta$

Los procesos que rigen la selección de los linfocitos $T\gamma\delta$ no se conocen tan bien como los de las $\alpha\beta$. El hecho de que se conozcan muy pocos ligandos naturales de los linfocitos $T\gamma\delta$ ha dificultado mucho el estudio de la selección de estas células en el timo. Experimentos con ratones KO para las moléculas MHC y β 2-microglobulina sugieren que la selección de las células $\gamma\delta$ es independiente de las moléculas MHC clásicas y de las no clásicas dependientes de β 2-microglobulina. Sin embargo, existe la posibilidad de que una pequeña parte de las células $\gamma\delta$ sí sean dependientes de MHC, o que fueran seleccionadas positivamente por la interacción con algún ligando aún no identificado (19).

Muchos estudios diseñados para averiguar si las células $\gamma\delta$ se seleccionan o no, se han basado en los ratones transgénicos G8 y KN6 que reconocen las moléculas MHC clase I no clásicas T10 y T22. Estos estudios parecen indicar que existe selección negativa de estos timocitos cuando encuentran ligandos de alta afinidad (20). Sin embargo, la existencia de selección positiva para estas células ha sido un tema más controvertido y aún no se ha alcanzado consenso en si tiene lugar o no (21) (22).

Por último, cabe destacar que no hay evidencia de la existencia de un receptor pre-TCR $\gamma\delta$, pues hasta la fecha no se ha identificado este posible receptor; además los genes *Tcr γ* y *Tcr δ* comienzan a reordenarse al mismo tiempo. Todo esto hace pensar que los linfocitos $T\gamma\delta$, a diferencia de los $T\alpha\beta$, no expresan un pre-TCR (21).

3. El receptor para antígeno del linfocito T (TCR)

El receptor de la célula T (TCR, del inglés *T Cell Receptor*) es un receptor transmembrana que se expresa en la superficie de todos los linfocitos T y que tiene la capacidad de reconocer antígenos, generalmente péptidos, unidos a moléculas MHC (fig. I2). La activación del TCR tras el reconocimiento antigénico desencadena respuestas biológicas muy complejas que incluyen la activación y diferenciación de los linfocitos T a células efectoras o de memoria en la periferia y sirven en último término para proteger al organismo frente a infecciones. Además, la señalización a través del TCR es esencial en distintas etapas de la maduración de los linfocitos T en el timo. La mayoría de receptores de membrana

reconocen ligandos no polimórficos. Sin embargo, el TCR es capaz de reconocer ligandos muy complejos formados por antígenos diversos unidos a MHC polimórficos que se expresan en la membrana de una segunda célula. La capacidad del TCR de reconocer infinidad de antígenos y MHC distintos reside en la organización genética de sus cadenas variables. Durante la maduración de los linfocitos T, los genes que codifican para las cadenas del TCR encargadas de unirse al ligando (α y β o γ y δ) sufren reordenamientos aleatorios que son responsables de la generación de TCR distintos en cada linfocito, de modo que cada clon de linfocitos T expresa un TCR diferente (2, 23).

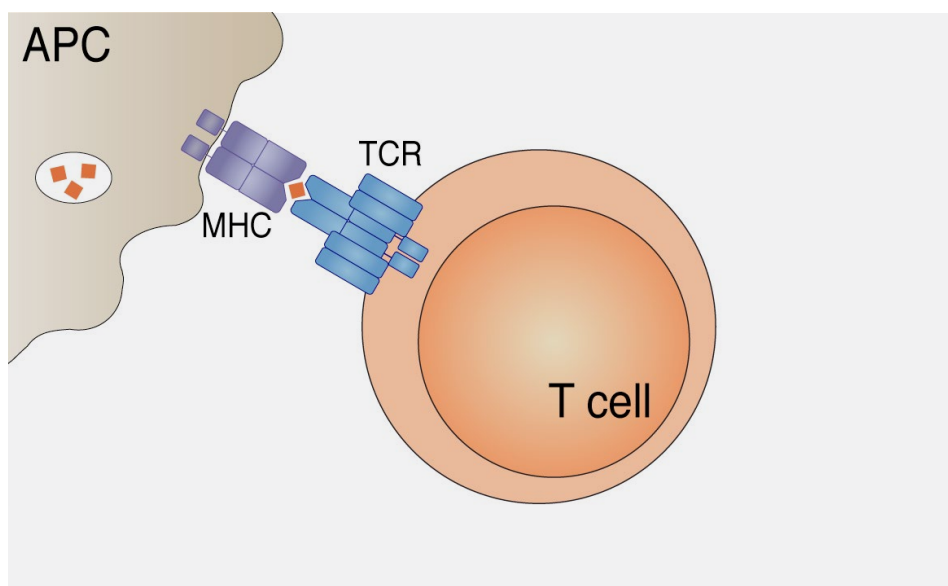


Figure I2: TCR ensemble recognizing an antigen-MHC complex on the surface of an antigen-presenting cell (APC).

3.1. ESTRUCTURA

El TCR es un complejo multimérico formado por un total de 8 subunidades o cadenas, 6 de ellas diferentes, y que forman 4 dímeros que se asocian entre sí de manera no covalente (fig. I3). El complejo está compuesto por un heterodímero de cadenas variables: TCR α y TCR β en el caso de los linfocitos T $\alpha\beta$ y TCR γ y TCR δ para los T $\gamma\delta$; y 3 dímeros de cadenas invariantes: CD3 γ CD3 ϵ , CD3 δ CD3 ϵ y $\zeta\zeta$ (24).

Las **cadenas variables** reconocen el ligando y se generan por recombinación somática de distintos segmentos génicos, V, D (sólo en las cadenas β y δ) y J, para generar un único gen V(D)J en cada linfocito en desarrollo. Estos reordenamientos permiten la generación potencial de aproximadamente 10^{17} - 10^{20} receptores diferentes en un individuo, aunque en la práctica la diversidad real es mucho menor (25). El gen V(D)J, único en cada clon de linfocitos T, codifica para la región variable del TCR y se transcribe junto con un gen C (constante) para formar las cadenas del receptor antígeno. El gen V(D)J codifica para la zona EC encargada del reconocimiento antígeno, mientras que el gen C codifica para el resto de la región EC, la región TM y la IC.

La estructura de las cadenas variables es muy parecida a la de las Ig, con una región EC mayoritaria formada por dos dominios globulares tipo Ig que conectan mediante un péptido conector con el dominio TM y un dominio IC muy corto. Las dos cadenas variables presentes en cada TCR se asocian mediante un puente disulfuro para formar un heterodímero (fig. I3).

Las **cadenas invariantes** se unen de manera no covalente a las cadenas variables y se encargan de transducir la señal de reconocimiento de éstas hacia el interior de la célula, ya que sus dominios IC son demasiado cortos para unir mediadores. Además estabilizan el complejo y hacen posible su expresión (26).

Las cadenas CD3 (γ , δ y ϵ) son muy homólogas entre sí y se cree que provienen de la duplicación de un gen ancestral común (27); poseen una región EC con un dominio tipo Ig, un péptido conector (más corto que en las cadenas TCR), una región TM y una cola citoplásmica larga que contiene un motivo ITAM implicado en la transducción de señales. Las cadenas CD3 se organizan formando heterodímeros ($\gamma\epsilon$ y $\delta\epsilon$) unidos no covalentemente.

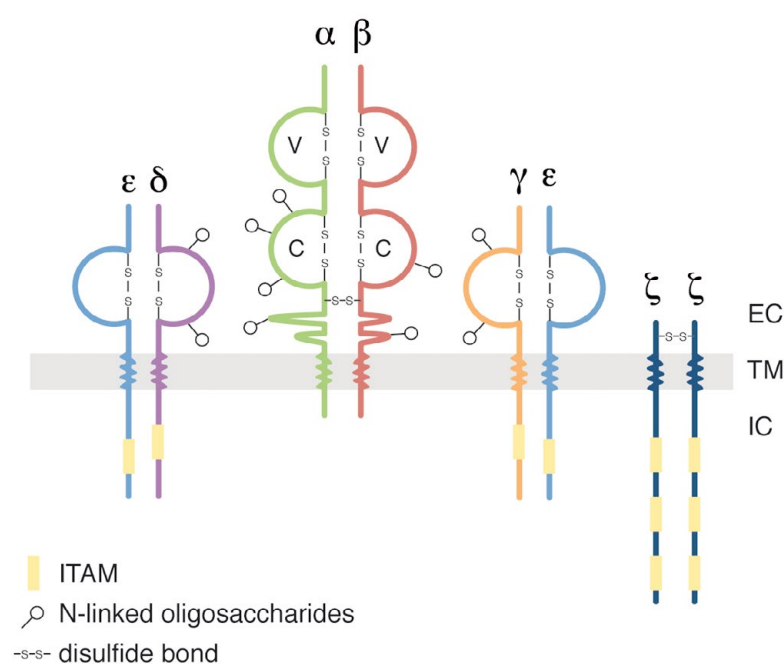


Figure I3: Schematic representation of an $\alpha\beta$ TCR molecule. V: variable region; C: constant region; EC: Extracellular; TM: Transmembrane; IC: Intracellular.

Table 1 Human TCR chain features.

CHAIN	TCR	KDa	DISULFIDE BOND ^a		CHROMOSOME	REGIONS	GLYCOSYLATION
			INTRA	INTER			
TCRα	αβ	45-60	2	1 with β	14 (q11-q12)	VJC	Yes
TCRβ	αβ	40-50	2	1 with α	7 (q35)	VDJC	Yes
TCRγ	γδ	45-60	2	0 or 1 with δ	7 (p14)	VJC	Yes
TCRδ	γδ	40-60	2	0 or 1 with γ	14 (q11-q12)	VDJC	Yes
CD3γ	αβ or γδ	25-28	1	0	11 (q23)	-	Yes
CD3δ	αβ or γδ	20	1	0	11 (q23)	-	Yes
CD3ε	αβ or γδ	20	1	0	11 (q23)	-	No
ζ	αβ or γδ	16	0	1 with ζ	1 (q24.2)	-	No

^a Intra: Intrachain, Inter: Interchain

La cadena ζ es muy diferente al resto de cadenas invariantes: posee una región EC muy corta, una región TM y una larga cola citoplásmica con 3 motivos ITAM (28). Cada TCR incorpora dos cadenas ζ que forman un homodímero (ζζ), el homodímero ζζ se forma principalmente por interacciones de los dominios TM y un puente disulfuro en la región extracelular que contribuye a su estabilidad (29).

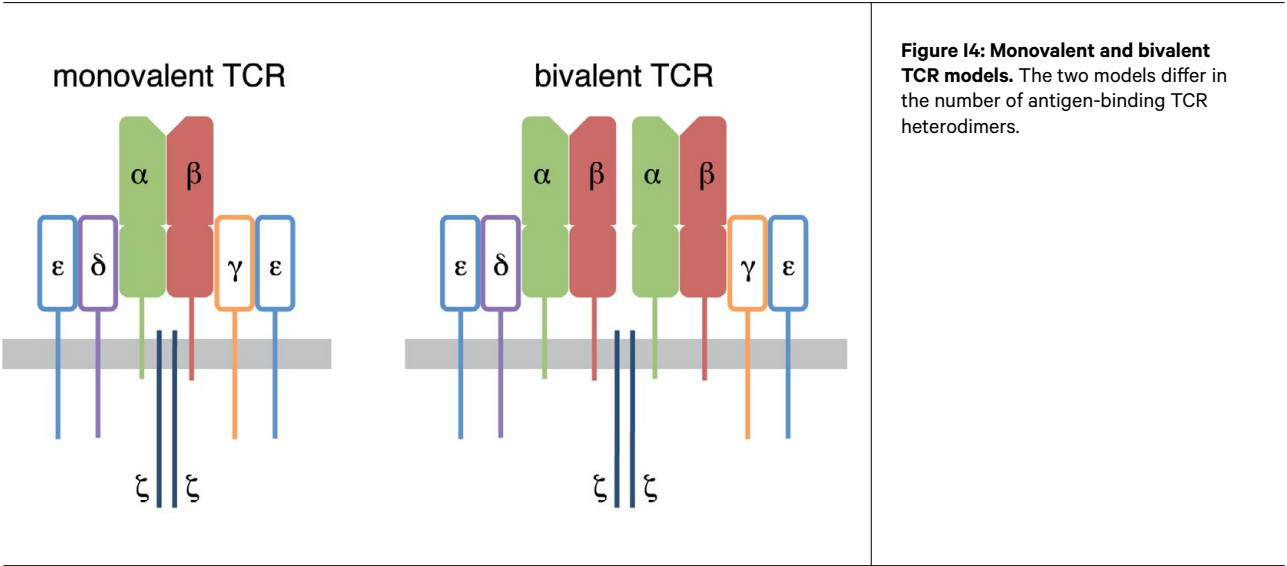
Las cadenas que forman el TCR sufren modificaciones post-transcripcionales que incluyen la formación de puentes disulfuro intra- e inter-catenarios y la adición de azúcares (glicosilación) en el RE y aparato de Golgi (Tabla 1).

3.2. VALENCIA Y ESTEQUIOMETRÍA

La estructura del TCR es aún objeto de debate, aunque se ha caracterizado la estructura atómica de los ecto-

dominios de las cadenas individuales, la organización estructural del receptor completo sigue siendo desconocida. Para determinar la valencia (número de heterodímeros TCR en cada complejo) y estequiometría (proporción de cada componente) del complejo se han utilizado diferentes aproximaciones, que se basan en las relaciones estequiométricas entre las distintas subunidades, la estructura molecular conocida de algunos dominios y datos bioquímicos que identifican las superficies de contacto entre subunidades.

Con respecto a la **valencia**, se han propuesto dos modelos, uno en el que formando parte del complejo sólo aparece un heterodímero TCR y un set de cadenas invariantes, modelo monovalente (30, 31). Y un segundo modelo que postula que en el receptor aparecen dos heterodímeros TCR, modelo bivalente (32-34) (fig. I4). Experimentos con células modificadas para que expre-



sen dos cadenas TCR β diferentes han demostrado que en cada complejo se incorpora sólo una cadena TCR β (24, 35, 36), por lo que el modelo monovalente es el más aceptado por la mayoría de investigadores, y es el que se usará en esta tesis.

Tampoco hay unanimidad con respecto a la **estequiometría** del TCR. Algunos grupos postulan que existen dos tipos de TCR (isoformas) según las cadenas invariantes que se incorporan: los TCR que incorporan CD3 γ pero no CD3 δ con una estequiometría de las cadenas invariantes ($\gamma\epsilon$) $_2(\zeta)_2$ y los que incorporan CD3 δ pero no CD3 γ con estequiometría ($\delta\epsilon$) $_2(\zeta)_2$ (32, 33, 37, 38) (fig.I5A). Sin embargo, otros grupos afirman que tanto CD3 γ como CD3 δ forman parte de un único complejo, que tendría estequiometría $\delta\epsilon\gamma\epsilon(\zeta)_2$ (24) (fig.I5B).

Dos líneas de evidencia apoyan la existencia de 2 isoformas diferentes de TCR: (i) al inmunoprecipitar el TCR con anticuerpos anti-CD3 δ , co-precipitan todas las cadenas del TCR excepto CD3 γ , y si se precipita con anticuerpos anti-CD3 γ tampoco co-precipita CD3 δ (38); (ii) existen células que expresan sólo una de las isoformas, los linfocitos T $\gamma\delta$ de ratón no incorporan CD3 δ , de modo que estos

TCR tienen dos dímeros $\gamma\epsilon$ (39); en la inmunodeficiencia humana de CD3 γ , los linfocitos T son capaces de expresar el TCR en ausencia de esta cadena y por tanto se cree que expresan dos dímeros $\delta\epsilon$ (40) y por último, experimentos en líneas celulares no T, transfectando con todas menos alguna de las cadenas que forman el TCR, demuestran que es posible la expresión del receptor en ausencia de CD3 γ o en ausencia de CD3 δ (41, 42).

El modelo de las 2 isoformas postula que las cadenas TCR α y TCR β se pueden unir indistintamente con los dímeros $\delta\epsilon$ o $\gamma\epsilon$. Sin embargo, experimentos realizados en microsomas (2) y en timocitos de ratón (43) muestran que TCR α se une exclusivamente con el heterodímero $\delta\epsilon$ y TCR β con $\gamma\epsilon$. Además técnicas de entrecruzamiento en la superficie celular han demostrado la interacción entre TCR β y CD3 γ (31, 44-46). Todos estos estudios apuntan hacia el modelo de una única isoforma como el modelo más probable.

Una de las preguntas que nos proponemos responder en esta tesis es si las isoformas del TCR existen realmente y en tal caso analizar si poseen capacidades de señalización diferentes.

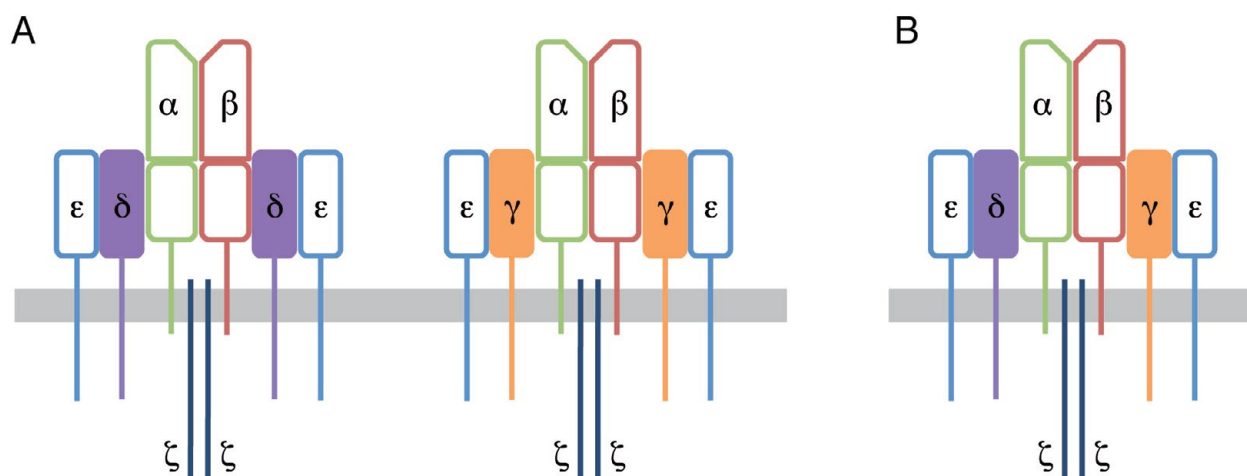


Figure I5: Two different models for TCR stoichiometry. A: Two isoforms model, CD3 γ and CD3 δ are in different TCR complexes. **B:** One isoform model, CD3 γ and CD3 δ are expressed in the same TCR complex.

3.3. ISOTIPOS

Existen tres isotipos diferentes de TCR según las cadenas variables que los componen (fig. I6). El primero en descubrirse fue el TCR $\alpha\beta$, que contiene las cadenas variables TCR α y TCR β y se expresa en la membrana de los linfocitos T $\alpha\beta$. En segundo lugar se descubrió el TCR $\gamma\delta$ en una población minoritaria de linfocitos T, los linfocitos T $\gamma\delta$, en este receptor intervienen las cadenas TCR γ y TCR δ . En último lugar se caracterizó un tercer tipo de TCR, el pre-TCR, que se expresa en la membrana de los timocitos durante su desarrollo en el timo y está formado por una cadena TCR β y una cadena pT α que suple a TCR α y que carece de regiones variables (47, 48).

Estos 3 isotipos de TCR poseen cadenas variables diferentes y por tanto diferente capacidad de unir ligandos. El pre-TCR, no reconoce ningún ligando, su simple expresión señala el éxito del reordenamiento de la cadena TCR β . El TCR $\alpha\beta$ reconoce péptidos unidos a moléculas MHC clásicas (MHC de clase I las CD8⁺ y de clase II las CD4⁺) o bien lípidos unidos a proteínas de la familia CD1 (moléculas MHC no clásicas) (49). Sin embargo, tan sólo se han identificado algunos de los ligandos del TCR $\gamma\delta$, que varían mucho en

tamaño, composición y estructura molecular. Entre los descritos hasta la fecha se encuentran moléculas MHC clásicas y no clásicas, proteínas solubles, péptidos pequeños, fosfolípidos, sulfolípidos y pequeños fosfoantígenos no peptídicos (50).

3.4. ENSAMBLAJE

El TCR es uno de los receptores conocidos más complejos. Está formado por un total de 8 péptidos, de los cuales 4 se glicosilan y 2 son variables. El ensamblaje es un proceso coordinado y secuencial; las cadenas se sintetizan hacia la luz del RE de forma independiente y posteriormente se establecen asociaciones entre ellas en el RE y aparato de Golgi para formar el receptor completo. Los dímeros CD3 se forman por interacción de sus dominios extracelulares tipo inmunoglobulina; seguidamente se unen a las cadenas TCR, el dímero $\delta\epsilon$ se une a TCR α mientras que el dímero $\gamma\epsilon$ se une a TCR β . Matthew Call y Kai Wucherpfenning (24, 31) desarrollaron un sistema en microsomas derivados de células B para estudiar el ensamblaje del TCR, con este sistema postularon que el primer paso en el ensamblaje era la unión del dímero $\delta\epsilon$ a TCR α , posteriormente se uniría TCR β y en último lugar el dímero $\gamma\epsilon$ para formar el TCR hexamérico. En

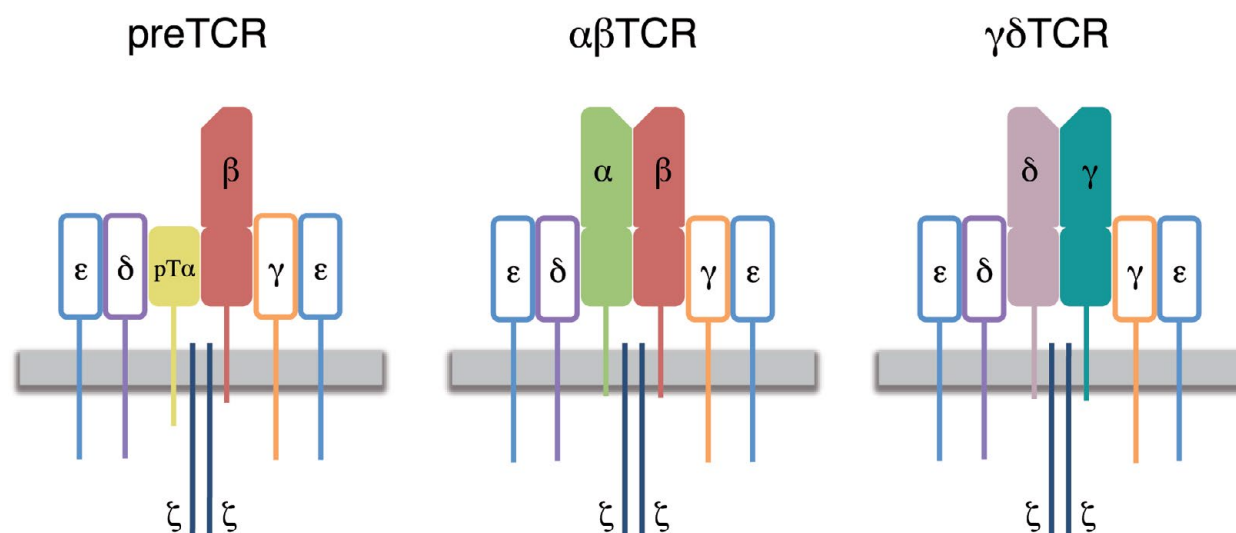


Figure I6: TCR isotypes
The pre-TCR, $\alpha\beta$ TCR and $\gamma\delta$ TCR.

último lugar el homodímero $\zeta\zeta$ se incorpora al TCR hexamérico en el aparato de Golgi para formar el receptor completo o TCR octamérico que se expresará en la membrana de la célula (fig. I7).

La unión de los dímeros CD3 y ζ a las cadenas TCR depende de interacciones no covalentes mediadas por aa cargados presentes en los dominios TM de todas las cadenas. Las cadenas TCR contienen 3 aa básicos cargados positivamente, 2 en TCR α y uno en TCR β , y las cadenas invariantes contienen 6 aa ácidos cargados negativamente, 2 en cada dímero, de modo que 2 cargas negativas presentes en las cadenas invariantes interaccionan con 1 carga positiva de las cadenas variables. Estos aa cargados de las regiones TM se encuentran conservados en todas las cadenas variables TCR, por lo que este mecanismo es aplicable a los 3 isotipos de TCR (29, 48).

La especificidad de unas cadenas por otras durante el ensamblaje viene determinada por las porciones extracelulares de las cadenas CD3 y TCR (51); de hecho si en células deficientes de CD3 γ se introduce una construcción quimérica de CD3 δ (dominios IC y TM) con la porción extracelular de CD3 γ , se rescata la expresión del TCR en superficie ((52) y Garcillán *et al* (en preparación)).

3.5. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

Varias de las cadenas que forman el TCR se glicosilan (Tabla I1); una vez que el péptido recién sinte-

tizado entra en el RE se produce la N-glicosilación. La enzima OST (transferasa de oligosacáridos) cataliza la unión del oligosacárido precursor común (GlcNAc₂Man₉Glc₃) a los aa asparagina (N); el oligosacárido precursor es rápidamente procesado por las α -glucosidasa I y II que eliminan residuos de glucosa y permiten la unión de las chaperonas calnexina y calreticulina, posteriormente se une a este complejo la chaperona Erp57 que cataliza la formación de puentes disulfuro. Las chaperonas ayudan al plegamiento del péptido y retienen a aquellos que no se hayan plegado correctamente (53-55).

Cuando los péptidos han adquirido su conformación nativa se liberan de las chaperonas y continúan su proceso de maduración. Este proceso supone básicamente una modificación de su estado de glicosilación, desde el RE hacia el aparato de Golgi.

En el RE se eliminan residuos de glucosa y de manosa, mientras que en el aparato de Golgi se generan los oligosacáridos complejos mediante pasos sucesivos, en los que se eliminan o añaden varios residuos de diferentes azúcares. Se eliminan residuos de manosa y se añaden ramas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) para crear el núcleo de oligosacárido común. En este punto el oligosacárido se hace resistente a la degradación por la enzima endoglicosidasa H (EndoH), por lo que la susceptibilidad a EndoH se usa como prueba operacional para determinar cuándo una glicoproteína ha abandonado el RE. Por último se gene-

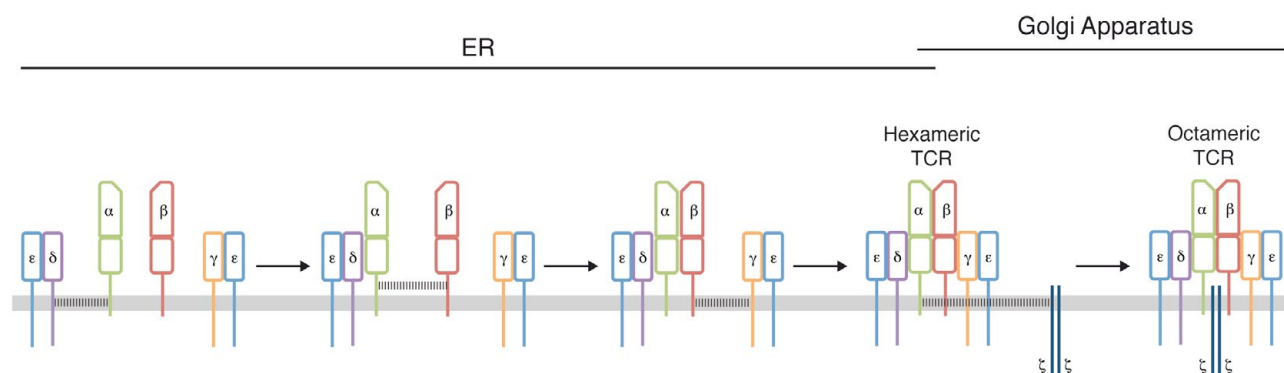


Figure I7: TCR assembly steps. Hexameric TCR is assembled in the ER in 3 sequential steps, and then is sorted to the Golgi apparatus, where association with the $\zeta\zeta$ homodimer takes place (based on the text, not the figures of Call *et al* 2002).

ra la región terminal, se añaden residuos GlcNAc que definen las estructuras ramificadas (56, 57) (fig. I8).

Todas estas modificaciones post-traduccionales, glicosilación, plegamiento y establecimiento de puentes disulfuro confieren estabilidad al péptido ayudándole a mantener su conformación nativa.

3.6. CONTROL DE CALIDAD Y TRANSPORTE A LA MEMBRANA

El TCR es un oligómero formado por 8 péptidos, 4 de ellos glicosilados. El control de calidad sobre el TCR es un proceso muy complejo que asegura que sólo aquellos correctamente plegados, completos y con estequiometría adecuada se expresen en la membrana (58).

El control de calidad sobre el TCR se ejerce a dis-

tintos niveles. En el RE se controla que sólo se exporten las cadenas bien plegadas y que además se hayan ensamblado en forma de TCR hexaméricos. Este control se realiza gracias a chaperonas, los aa polares de las regiones TM y secuencias de retención en el RE. Además, en el aparato de Golgi se controla que sólo se exporten a la membrana los TCR completos.

Las **chaperonas** calnexina, calreticulina, BiP y la oxidoreductasa Erp57 se unen a los péptidos recién glicosilados ayudando a su correcto plegamiento, es decir, a que adquieran su conformación nativa, e impidiendo que los péptidos mal plegados salgan del RE hacia el aparato de Golgi (54, 59, 60). Las proteínas mal plegadas son sustrato de la glucosiltransferasa UGT1 que es capaz de distinguir los péptidos mal plegados y marcarlos añadiendo un residuo de

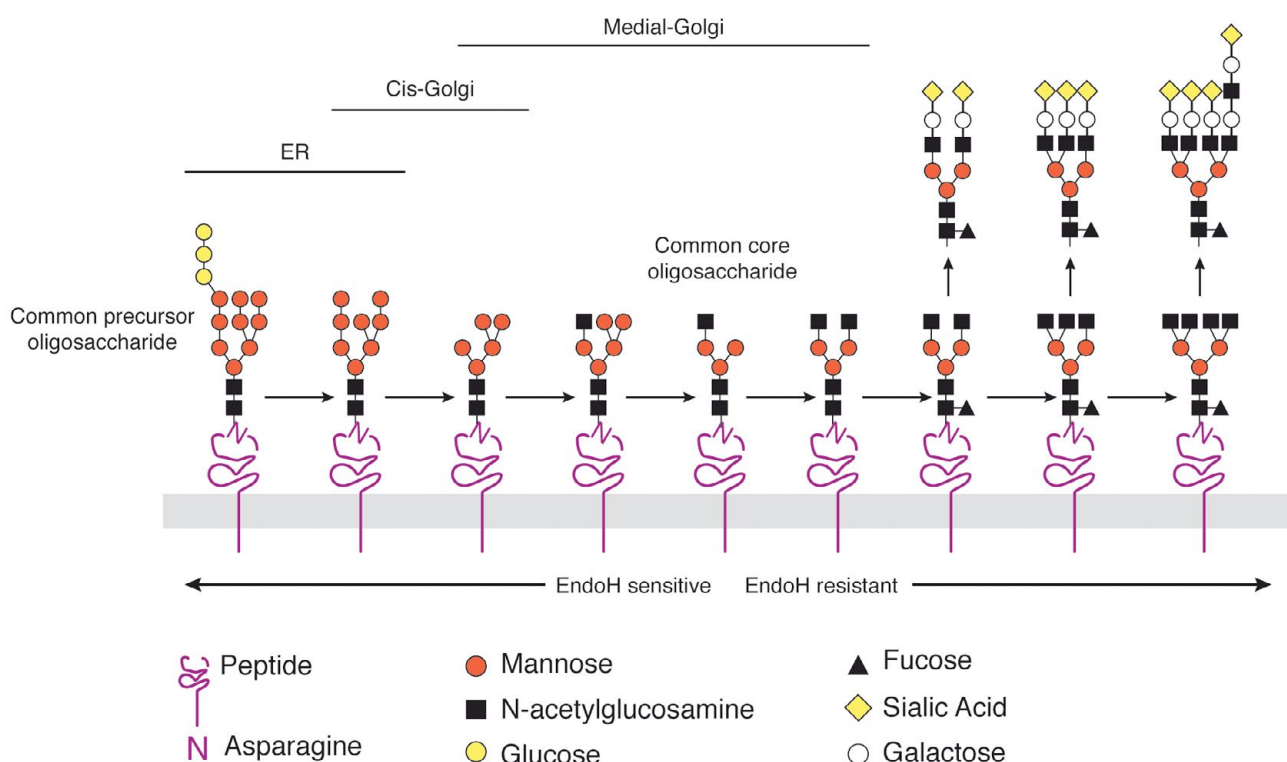


Figure I8: N-Glycosylation of a nascent polypeptide. Glycosylation begins in the Endoplasmic Reticulum (ER) with the addition of the common precursor oligosaccharide, followed by trimming and addition of different sugars in the ER and Golgi apparatus. Adapted from Lowe *et al* 2001.

glucosa al oligosacárido para que vuelvan a ser reconocidas por las chaperonas y tengan otra oportunidad de plegarse correctamente. Si tras varios ciclos la proteína sigue sin adquirir su conformación nativa, será sustrato de la manosidasa I, que elimina un residuo de manosa, haciendo que la glicoproteína sea reconocida por la lectina EDEM (proteína similar a α -manosidasa) que la desviaré hacia la ruta de degradación asociada al RE (ERAD) (54, 55) (fig.19).

Los TCR incompletos o mal plegados se retienen en el RE y finalmente se degradan en el citosol o bien pueden circular entre el RE y compartimentos post-RE en un proceso dependiente de chaperonas (54). Este mecanismo es el que usan las proteínas residentes en el RE, como las chaperonas, para mantener su localización subcelular, pero si se unen a otras proteínas, éstas también son transportadas retrógradamente hacia el RE (fig. 110). Es decir, que la retención en el RE no es un proceso estático, no sólo se retienen, sino que también se recuperan desde localizaciones post-RE. Para una de las cadenas del TCR se han descrito fenómenos de recuperación hacia el RE: al expresar

TCR α en células COS en ausencia del resto de cadenas que forman el TCR, se ha observado que esta cadena circula entre el RE y un compartimento post-RE en un proceso dependiente de la chaperona BiP (61).

Los **aa cargados de las regiones TM**, además de ser esenciales para el ensamblaje (como se ha explicado en el apartado 3.4), sirven como señales de control de calidad del RE. Al ensamblarse las distintas subunidades, los aa polares quedan enmascarados, mientras que las cadenas aisladas tienen expuesto este residuo y son rápidamente reconocidas por el canal Sec61 que las transportará retrógradamente al citosol, donde serán ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma (48).

Además, las subunidades que forman el TCR, al igual que otros complejos multiméricos, poseen **señales de retención en el RE** que también se van enmascarando según el multímero se forma, y que impiden la expresión de complejos incompletos en la superficie de la célula (62). Se han identificado este tipo de secuencias en varias subunidades del

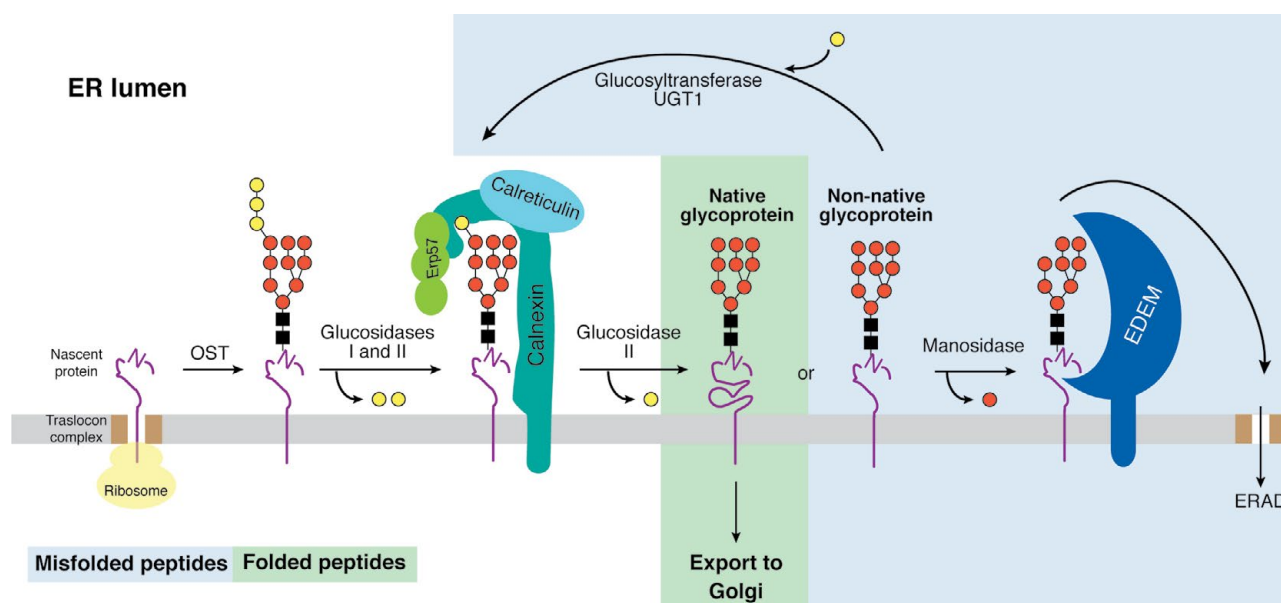


Figure 19: Quality control in the ER. After addition of the preassembled oligosaccharide the two outermost glucoses are removed and the nascent polypeptide associates with the chaperones calnexin, calreticulín and the oxidoreductase Erp57. Chaperones assist the proper folding and Erp57 catalyzes the formation of disulfide bonds. Most of the glycopolypeptides are released as native proteins and exit the ER. Misfolded polypeptides enter cycles of dissociation/reassociation with chaperones for more folding attempts; eventually misfolded glycoproteins are recognized by EDEM (ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein) and retrotranslocated to the cytosol for ER associated degradation (ERAD). Adapted from Ruddock *et al* 2006.

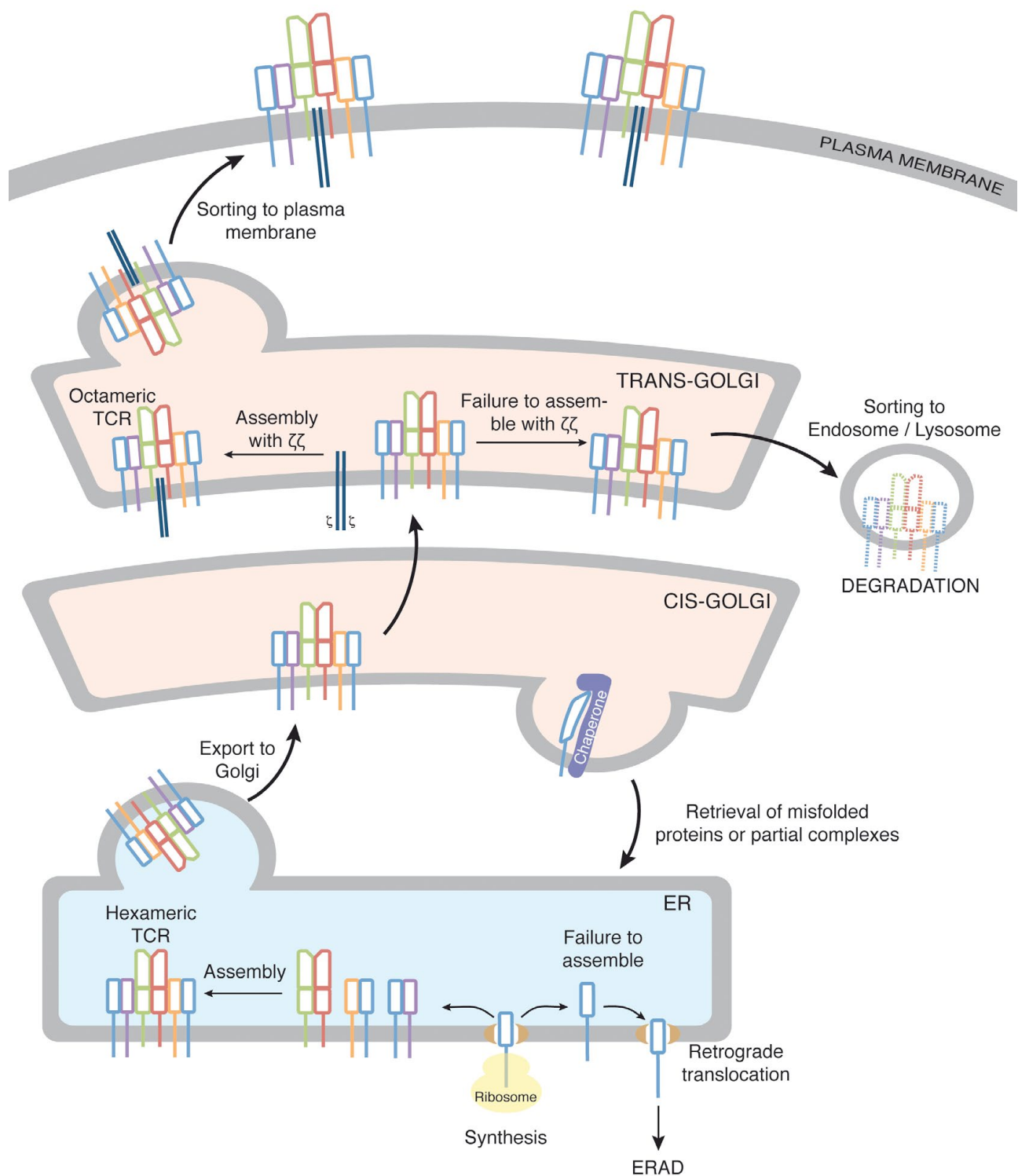


Figure I10: Assembly and transport of the TCR. TCR chains are synthesized and transported into the lumen of the ER, where the chains mature and fold with the help of chaperones and assembly of the hexameric TCR takes place. Misfolded and unassembled chains are retro-translocated to the cytosol and are degraded by the proteasome in a process called ER-associated degradation (ERAD). Once assembled and correctly folded, the hexameric TCR is transported in vesicles to the Golgi complex where assembly with the $\zeta\zeta$ homodimer occurs. Misfolded proteins can return to the ER in a process dependent on chaperones for re-folding. Hexameric TCR that fail to assemble with $\zeta\zeta$ are sorted and degraded in lysosomes. Adapted from Call *et al* 2005 and Ellgaard *et al* 2003.

TCR, TCR β (62, 63), CD3 γ , CD3 δ (64) y CD3 ϵ (65, 66). En primer lugar se enmascaran las señales presentes en CD3 γ y CD3 δ al formar dímeros con CD3 ϵ . Por su parte, las señales presentes en TCR β se enmascaran al formarse el TCR hexamérico, mientras que la señal presente en CD3 ϵ es la última en inactivarse, aunque no se ha determinado exactamente el paso en que queda enmascarada, se ha argumentado que podría inactivarse al incorporarse $\zeta\zeta$ al complejo (66).

En definitiva, las cadenas aisladas o mal plegadas y los TCR parcialmente ensamblados quedan retenidos en el RE donde son relativamente estables. Sólo los TCR hexaméricos ($\alpha\beta\delta\gamma\epsilon\zeta$) serán transportados al aparato de Golgi (67). Sin embargo, la cadena ζ es transportada y retenida en el aparato de Golgi independientemente del resto de cadenas del TCR. Posee señales de retención en el aparato de Golgi que son sólo enmascaradas al formarse el TCR octamérico (58).

Un último nivel de regulación se encuentra en la región citoplásmica de CD3 γ (posiblemente también de CD3 δ), ésta contiene un motivo di-leucina (di-L) que permite que las proteínas adaptadoras AP-1 y AP-2 se unan al TCR hexamérico dirigiéndolo hacia la ruta de degradación lisosomal (48). El motivo di-L sólo queda enmascarado al incorporarse $\zeta\zeta$ al TCR en el aparato de Golgi para formar TCR octaméricos completos que serán transportados en vesículas a la membrana plasmática mientras que los TCR que no incorporen $\zeta\zeta$ serán desviados en endosomas hacia los lisosomas para su degradación (68).

La expresión de TCR completos en la superficie está limitada por la cantidad de ζ disponible en el aparato de Golgi pues las cadenas TCR y CD3 se sintetizan en exceso, de hecho la mayoría (85–95%) de las sintetizadas *de novo* son degradadas. Sin embargo, la cadena ζ es sintetizada en menor cantidad y por tanto el 80–100% de esta cadena es incorporada al TCR (69).

3.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA

El nivel de expresión del TCR es bastante constante en la superficie de las células, ya que existe un

equilibrio entre los procesos que reponen receptores (síntesis *de novo* y reciclaje) y los que los consumen (internalización y degradación). Existen dos vías responsables de la internalización del TCR, la vía dependiente de PKC-CD3 γ y la vía dependiente de Lck-ZAP70-Cbl-Ubiquitina.

La **vía PKC-CD3 γ** media los procesos de reciclaje; la proteína quinasa PKC fosforila la Ser¹²⁶ de CD3 γ haciendo accesible el motivo di-L al complejo adaptador AP-2 que dirige la endocitosis del receptor hacia vesículas de reciclaje.

Sin embargo, la **vía Lck-ZAP70-Cbl-Ubiquitina** dirige a los TCR internalizados hacia los lisosomas para su degradación. Este proceso es dependiente de la fosforilación, por parte de Lck, de los ITAM de las cadenas invariantes. ZAP70 será reclutado a los ITAM fosforilados para también ser fosforilado por Lck. Por último, Cbl reconoce p-ZAP70 y media la ubiquitinación del TCR que va a ser responsable de la endocitosis y degradación de éste (70).

En estado basal cierta cantidad de receptor es endocitado a la vez que una cantidad equivalente es exocitado. Se cree que este reciclaje constitutivo del TCR podría servir como un mecanismo de control de calidad, pues de este modo la célula podría eliminar los TCR dañados y reexpresar los intactos. Diversos estudios con líneas mutantes para el motivo di-L de CD3 γ (71) o en líneas humanas deficientes en CD3 γ (72, 73) han determinado que ese proceso es dependiente de la vía PKC-CD3 γ (70). Se ha estimado que la tasa de internalización constitutiva del TCR en membrana es del 1% por minuto (74).

Además de los procesos de internalización constitutiva, existe modulación de la expresión del receptor inducida por ligando. Cuando una célula T encuentra un antígeno, el número de TCR en la superficie de la célula disminuye drásticamente (hasta 90% menos de expresión) como resultado de un aumento de la endocitosis del TCR. El significado fisiológico de la internalización inducida por ligando no se conoce todavía con exactitud pero se considera que constituye un mecanismo para finalizar la señalización del re-

ceptor activado, y prevenir así la hiperestimulación que podría causar patologías autoinmunes o transformaciones celulares malignas (75, 76). En la internalización del TCR mediada por ligando participan las dos vías anteriormente descritas (71). Además varios estudios afirman que no sólo los TCR activados se internalizan, también lo harían TCR inactivos por un proceso al que denominan co-modulación y que sería dependiente de la vía PKC-CD3 γ (77).

3.8. PAPEL ESPECÍFICO DE LAS DISTINTAS CADENAS INVARIANTES DEL TCR

Como ya se ha explicado anteriormente el TCR es un complejo multimérico formado por 8 cadenas, 2 cadenas variables encargadas del reconocimiento antigénico y 6 cadenas invariantes encargadas de estabilizar el complejo y de transducir las señales. Aún está por determinar por qué son necesarias 4 proteínas invariantes diferentes para la estabilización y función del complejo y si cada una de ellas tiene un papel diferente. Ha sido posible atribuir ciertas funciones específicas a cada una de las cadenas: se ha establecido que la región IC de ζ es de gran importancia en la transmisión de señales, que la región rica en prolina de CD3 ϵ es necesaria para la unión de Nck y que el motivo di-L presente en CD3 γ es importante para la internalización del TCR, pero aún no se han podido identificar funciones específicas, en lo que a transmisión de señales se refiere, de cada una de las cadenas.

Se cree que las 3 cadenas CD3 presentes en mamíferos, pese a su alta homología, no tienen funciones redundantes. Las cadenas CD3 δ y CD3 γ poseen un alto porcentaje de homología y se cree que provienen de una duplicación génica que ocurrió hace 230 millones de años; de hecho encontramos un precursor común a ambas en la filogenia, presente en anfibios, peces y aves, llamado CD3 $\gamma\delta$, lo cual nos da una idea de cuan próximos y solapantes pueden llegar a ser sus papeles (78). Pese a que la duplicación génica es relativamente reciente, las cadenas CD3 γ y CD3 δ de mamíferos han de tener funciones diferentes ya que al menos sus porciones EC no son intercambiables (52). La aparición de dos dímeros

CD3 diferentes ocasionó que las cadenas TCR α y TCR β se hicieran específicas de cada uno de los dímeros, de modo que $\delta\epsilon$ sólo se une a TCR α y $\gamma\epsilon$ sólo a TCR β (79).

Una de las estrategias para poder atribuir funciones específicas a cada una de las cadenas CD3 es analizar TCR a los que les falte una de ellas. En este sentido se han seguido varias estrategias diferentes: ratones KO, pacientes con deficiencias en alguna de las cadenas CD3, líneas celulares a las que les falta alguna de las cadenas y líneas no T donde se transfectan todas las cadenas excepto una.

Del estudio de ratones KO y humanos deficientes se deduce que para la selección de los linfocitos T son necesarias todas las cadenas invariantes excepto la cadena CD3 γ en humanos; y que la cadena CD3 δ no es imprescindible para el desarrollo de los linfocitos T $\gamma\delta$ de ratón, ya que el TCR $\gamma\delta$ mürido no incorpora esta cadena (fig. I11). Por tanto, al haber un bloqueo en el desarrollo de las células T sólo es posible el estudio del TCR humano carente de CD3 γ . Las células deficientes en CD3 γ se han estudiado exhaustivamente en nuestro laboratorio durante los últimos 20 años y se ha determinado que expresan un TCR con dos dímeros $\delta\epsilon$ (40), que los niveles de expresión en membrana son aproximadamente la mitad que en una célula control y que ciertas funciones celulares dependientes de la señalización a través del TCR se ven afectadas (síntesis de IL-2, adhesión, fosforilación de tirosinas,

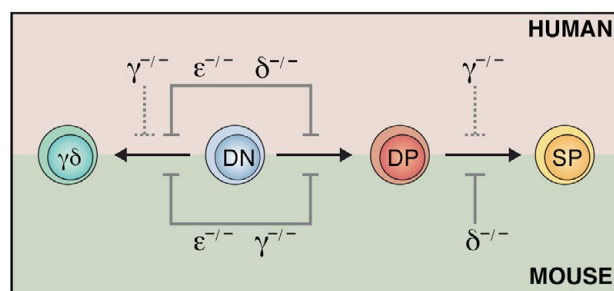


Figure I11: Role of CD3 chains in mouse and human T cell development. Comparative partial (dashed lines) or total (solid lines) impact of CD3 defects in human and murine T cell development.

internalización del TCR...), mientras que otras no (síntesis de IFN- γ y TNF- α , proliferación, reorganización del citoesqueleto de actina...). También se ha determinado que la asociación del TCR con el homodímero $\zeta\zeta$ es más inestable que en células normales (40, 72, 73, 80-83). De esta manera, ha sido difícil asignar funciones específicas a la cadena CD3 γ . Se podría argumentar, por ejemplo, que CD3 γ es necesaria para la síntesis de IL-2, pero este defecto también podría atribuirse a la disminución en los niveles de expresión del TCR o a la lábil unión de ζ al TCR carente de CD3 γ .

También se han generado varias líneas celulares tanto murinas como humanas, con mutaciones en alguna de las cadenas que forman el TCR (84-86). El análisis de estas líneas permite concluir que para la expresión del TCR son necesarias todas las cadenas CD3. Los resultados obtenidos con la línea humana Jurkat Gamma Negativa (JGN) indican que CD3 γ es imprescindible para la expresión del TCR (86), y por tanto discrepan con lo observado en los individuos deficientes en CD3 γ (fig. I12). Esta diferencia puede deberse a que la línea JGN fue seleccionada para no expresar el TCR o a que perder la cadena CD3 γ antes o después de pasar por el timo no tenga las mismas consecuencias.

Por último cabe destacar los experimentos realizados en células no T donde se transfectan las cadenas que constituyen el TCR. Dos estudios que utilizan las cadenas TCR murinas afirman que CD3 γ y CD3 δ no son imprescindibles para la expresión del TCR en superficie (41, 42), mientras que otro estudio que analiza el ensamblaje de las cadenas humanas en microsomas derivados de células B, determinó que para la asociación de ζ eran necesarias tanto CD3 γ como CD3 δ (31).

Es decir, que pese a todas las estrategias seguidas y todos los estudios realizados, no se ha conseguido atribuir funciones específicas a cada una de las cadenas CD3, y además las distintas estrategias han arrojado en varios casos conclusiones discrepantes. En esta tesis propondremos una nueva estrategia para el estudio de los requerimientos de las cadenas CD3 γ y CD3 δ para la expresión del TCR humano y trataremos de explicar por qué los distintos sistemas han llevado a conclusiones contradictorias.

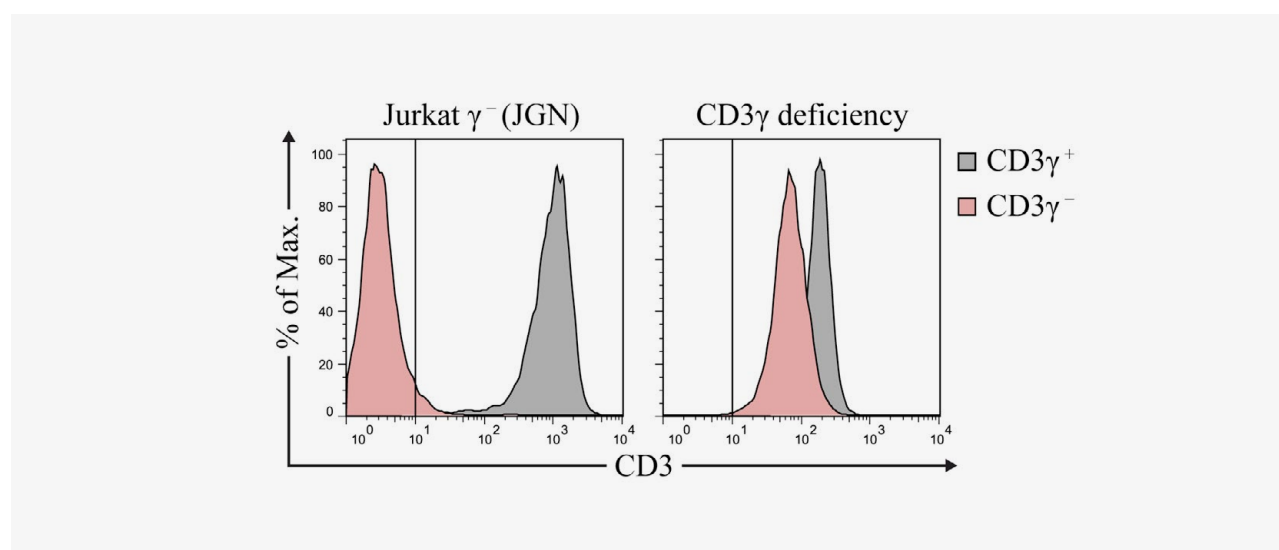


Figure I12: Surface TCR expression in two human CD3 γ ⁻ models. Comparative impact of CD3 γ deficiency on surface TCR expression in a Jurkat mutant cell line termed JGN (for Jurkat Gamma Negative) and in primary T cells from congenital selective CD3 γ deficiency.

3.9. SEÑALIZACIÓN

El reconocimiento de antígeno unido a MHC (pMHC) sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno, por parte del heterodímero variable, va a desencadenar vía CD3 y ζ numerosas cascadas de señalización que tienen como resultado la transcripción de genes cuyos productos median las respuestas y las funciones de los linfocitos T activados.

Aún no se conoce con exactitud cómo se transmite la información desde el heterodímero variable hasta las porciones citoplásmicas de las cadenas invariantes. Se han propuesto varios modelos en los que **cambios conformacionales, agregación del TCR**, o ambos, serían los responsables de iniciar la señal (87-89). Recientemente se ha propuesto un modelo en que la transmisión de la señal ocurriría gracias a modificaciones en la estructura cuaternaria del receptor. Este modelo propone que el dímero $\alpha\beta$ sería capaz de moverse con respecto a los dímeros CD3 gracias a la flexibilidad de sus péptidos conectores (90).

Los dominios IC de CD3 ϵ y ζ , pero no los de CD3 γ y CD3 δ , se encuentran embebidos en la membrana plasmática, de modo que sus ITAM están protegidos de la acción de las Src quinasas y por tanto se evita la fosforilación cuando el receptor no está unido a ligando (29). Cuando el TCR reconoce un pMHC específico se producen cambios conformacionales que liberan los dominios citoplásmicos de la membrana y los hacen accesibles a la acción de las Src quinasas (fig. I13) (91).

Cambios conformacionales en la cadena CD3 ϵ son también responsables de la unión de la proteína adaptadora Nck a la región rica en prolina (PRS) presente en el tallo citoplásmico de CD3 ϵ . Este cambio conformacional es previo a la fosforilación de los ITAM de las cadenas invariantes y se cree que podría activar o reclutar a moléculas necesarias para la posterior fosforilación de éstos (92, 93).

Además de los modelos de cambio conformacional, existen modelos de agregación que postulan que en la superficie de una célula T coexisten TCR en for-

ma monovalente y multivalente, de modo que los TCR multivalentes u oligoméricos serían más sensibles a bajas concentraciones de ligando y los monovalentes sólo se activarían a altas concentraciones (94-97). De hecho se ha comprobado que las células que han estado en contacto con antígeno poseen oligómeros de mayor tamaño y que esto les confiere mayor sensibilidad (98).

Tras la activación del TCR se desencadenan cascadas de señalización intracelulares que involucran proteínas tirosín-quinastas (PTK) y proteínas adaptadoras. En primer lugar, los correceptores CD4 o CD8 se unen a regiones no polimórficas de las moléculas MHC y aproximan a Lck (PTK de la familia Src) a las colas citoplásmicas del TCR. Lck entra en contacto con los ITAM del TCR y los fosforila, generando sitios de unión para proteínas con dominios SH2 como ZAP70 (PTK de la familia Syk), que a su vez también será fosforilada por Lck. ZAP70 en su conformación activa fosforila a la proteína adaptadora LAT, que recluta gran cantidad de moléculas señalizadoras para formar un complejo multiproteico denominado signalosoma LAT. El signalosoma LAT activa varias rutas de señalización (MAPK/Erk, PI3K/Akt y PLC γ -1) que activan a los factores de transcripción Fos, Jun, NF- κ B y NFAT, que a su vez controlan la expresión de genes importantes en la respuesta y regulación de la célula T (IL-2, citlinas, genes de la familia Bcl-2...). Además de estas cascadas de señalización, se activan integrinas, modificándose la adhesión celular y se reorganiza el citoesqueleto de actina (88, 99).

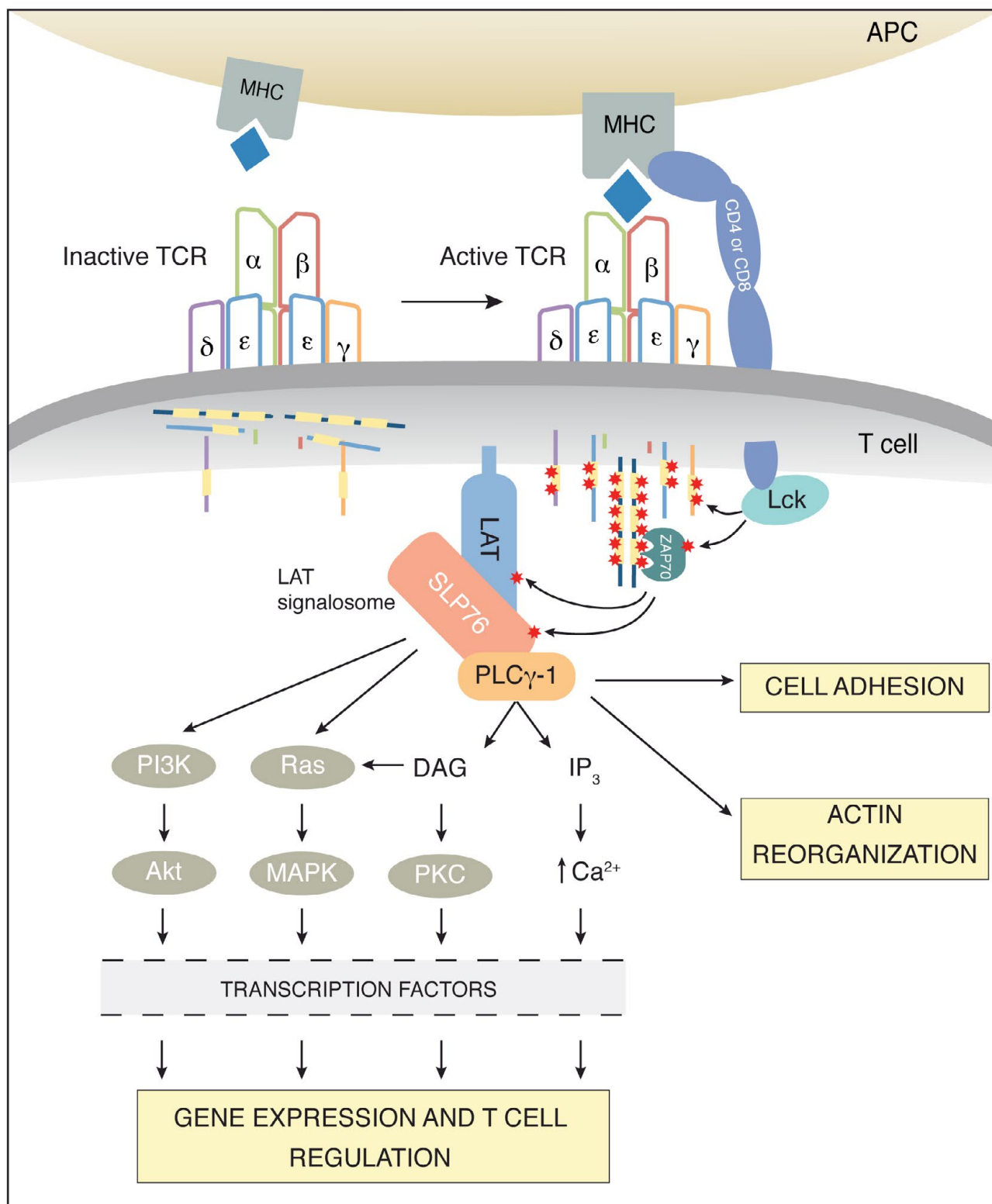


Figure I13: TCR signaling. TCR signal transduction is initiated by the recognition of peptide–MHC molecules. The cytoplasmic tails of CD3 and ζ are then released from the membrane, exposing their ITAM sequences. The first molecule to be recruited to the TCR is Lck, which phosphorylates the ITAMs of the invariant chains. Then, ZAP-70 is recruited and is also phosphorylated by Lck. Activated ZAP-70 phosphorylates LAT, which recruits numerous signaling molecules to form a multiprotein complex, termed the LAT signalosome. The LAT signalosome propagates the signal to three major signaling pathways, namely MAPK/Erk, PI3K/Akt and PLC γ -1, leading to the mobilization of transcription factors that are critical for gene expression and essential for T cell growth and differentiation. Signals initiated from the TCR also result in actin reorganization and the activation of integrins by inside-out signaling. Adapted from Brownlie *et al* 2013 and Kuhns *et al* 2012.

4. Deficiencias congénitas del TCR

4.1. INTRODUCCIÓN

Las deficiencias humanas de alguna de las cadenas que componen el TCR son enfermedades autosómicas recesivas de baja prevalencia. La primera inmunodeficiencia ligada al TCR se describió en una familia española en 1986 (100). Años después se demostró que la inmunodeficiencia estaba causada por la ausencia de la cadena CD3 γ (81). Posteriormente se describieron mutaciones en el resto de cadenas invariantes del TCR y en la cadena TCR α ; todos los casos descritos hasta la fecha se muestran en la Tabla 2.

Estas mutaciones afectan selectivamente al desarrollo de las células T causando linfopenia T más o menos grave y baja expresión del TCR en membrana. Cuando la mutación ocurre en una de las cadenas variables, como en el caso de la deficiencia de TCR α , sólo los linfocitos T $\alpha\beta$ se ven afectadas. Sin embargo, si la mutación ocurre en alguna de las cadenas invariantes, tanto los linfocitos T $\alpha\beta$ como los T $\gamma\delta$ se ven perjudicados. Las deficiencias de CD3 δ

o CD3 ϵ se caracterizan por presentar linfopenia T muy severa, mientras que las deficiencias de CD3 γ o ζ cursan con una linfopenia menos grave. Además de las deficiencias completas, también se han descrito para CD3 δ y CD3 ϵ deficiencias parciales (o *leaky*), en los que existe cierto nivel de proteína normal (116).

Dependiendo de la cadena afectada y de si la deficiencia es completa o parcial, aparecen distintas manifestaciones clínicas, que van desde individuos sanos o con autoinmunidad a individuos con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Los casos más severos se suelen manifestar en el primer año de vida y cursan con infecciones respiratorias recurrentes, diarrea crónica, retraso en el desarrollo e incluso la muerte si no se realiza trasplante de médula ósea. En algunos pacientes se han observado características del síndrome de Omenn (hipereosinofilia, hiper-IgE, y dermatitis atópica). Sin embargo, no se observan infecciones piogénicas crónicas, ni rasgos

PROTEIN	REFERENCES		NUMBER OF CASES	
	COMPLETE	PARTIAL	FAMILIES	PATIENTS
CD3 γ	(81, 101-105)		4	7
CD3 δ	(106-109)	(110)	9	18
CD3 ϵ	(107)	(111)	2	4
ζ	(112-114)		3	3
TCR α	(115)		2	2
TOTAL			20	34

Table 2: TCR deficiencies. Number and references of all reported cases are indicated.

dismórficos o anomalías óseas como en otras inmunodeficiencias. Todos los pacientes descritos hasta la fecha se resumen en la Tabla 3.

Las deficiencias completas de CD3 δ y CD3 ϵ son las más graves, cuando una de estas cadenas falta, el timo es incapaz de generar linfocitos T maduros. Estos pacientes se caracterizan por padecer linfopenia T muy severa, que afecta tanto al linaje $\alpha\beta$ como al $\gamma\delta$; suelen ser diagnosticados en los primeros meses de vida con SCID y si no se lleva a cabo trasplante de médula ósea mueren por infecciones.

La deficiencia de TCR α fue la primera en describirse en la que una de las cadenas variables estaba afectada. Los 2 pacientes descritos sufrían linfopenia T $\alpha\beta$ con números normales de linfocitos T $\gamma\delta$. Pese a carecer de una cadena crítica para la función T, permanecieron relativamente sanos durante unos años (se trasplantaron con 6 y 7 años), eran capaces de producir anticuerpos frente a vacunas y autoantígenos y formaban centros germinales en los ganglios linfáticos. Se cree que en estos pacientes los linfocitos T $\gamma\delta$ serían capaces de ayudar a las células B para que realizaran el cambio de isotipo. Sin embargo, ambos mostraban fenómenos de autoinmunidad. Aun en ausencia de la cadena TCR α existe cierto número de linfocitos T $\alpha\beta$ en periferia, quizás expresando el receptor con la cadena pT α o un homodímero TCR β . Se ha argumentado que quizás estas células con un TCR aberrante pudieran ser responsables de los fenómenos de autoinmunidad observados en los pacientes (115).

Las deficiencias de CD3 γ y ζ suelen ser menos severas ya que en estos casos existe cierto nivel de expresión del TCR que permite la selección de cierto número de linfocitos T en el timo. La deficiencia humana de CD3 γ es quizás la más interesante, no sólo porque es posible la expresión del TCR con otra estequiometría (($\delta\epsilon$) $_2$ (ζ) $_2$), sino también porque los efectos que causa en los pacientes son muy dispares. Las manifestaciones clínicas de los pacientes deficientes de CD3 γ van desde SCID a totalmente sanos; esta disparidad se manifiesta incluso entre pacientes de una misma familia y que por tanto com-

parten la misma mutación (103). Los 3 pacientes descritos con deficiencia de la cadena ζ muestran una leve linfopenia T (especialmente CD4) y una reducción en los niveles de expresión del TCR muy severa (alrededor de un 90% de reducción).

Pese a que la linfopenia no es muy llamativa, estos pacientes sufren infecciones graves y se recomienda trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Las inmunodeficiencias parciales o las menos graves como las de CD3 γ y TCR α suelen asociarse con fenómenos de desregulación inmunitaria como autoinmunidad, enfermedades inflamatorias, hiper-IgE e hipereosinofilia. Esta característica es común a otras inmunodeficiencias T parciales asociadas con el desarrollo o señalización de los linfocitos T (*RAG1*, *RAG2*, *ZAP70*, *WAS*...). Se cree que en estos casos en los que hay menor número de linfocitos T o menor señalización, los mecanismos que gobiernan la tolerancia se ven afectados, bien por defectos en la selección negativa o bien por disminución o menor actividad de las células T reguladoras (117).

4.2. DEFICIENCIA PARCIAL DE CD3 δ

En el año 2011 nuestro grupo publicó un artículo en el que se describían los 2 primeros casos de deficiencia parcial de CD3 δ (118). Se trataba de dos niños de origen ecuatoriano no emparentados y de familias no consanguíneas (pacientes 17 y 18 de la Tabla 3). Ambos presentaban características de SCID y recibieron TPH.

El primer paciente, **AIII.1**, ingresó en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón a los 6 meses de edad por bronconeumonía y bronquiolititis, posteriormente presentó *muguet*, y a los 13 meses dermatitis atópica y diarrea severa causada por *Salmonella*, *Campylobacter* y *Cryptosporidium*. Los análisis inmunológicos revelaron linfopenia T, timo de tamaño normal, hipereosinofilia, niveles normales de IgG, IgM e IgA y niveles muy elevados de IgE. Sin embargo, la función B mediada por linfocitos T estaba alterada ya que no se generaban anticuerpos específicos tras vacunación, mientras que los anticuerpos naturales (IgM) frente a poli-

Deficiency	CD3 γ						CD3 ϵ			ζ			TCR α	
Family	1	2	3	4			1	2	3	1	2	3	1	2
Ethnic background	Turkey		Spain	Turkey			France			Caribbean	Hawaii	Turkey	Pakistan	
Patient/sex	1M	2M	3M	6F	7F	5M	1M	2F	3M	4F	1M	2F	3F	2M
Consanguineous	Yes		No	No	Truncation		No	Yes			NR ⁵	No	Yes	Yes
Mutation (<i>leaky</i>) ⁷	Truncation		Trunc, Het	Truncation			Skip7, Tr, Het			Truncation			Trunc	Skip3
Diagnosis at (m) ¹	3	7	48	12	240	48	48	5	1	0	4	10	13	6
% CD3 ⁺ cells ^{2,6}	37	27	30	10	45	63	63	NR ⁵	NR	<1	21	64	60	50
HSCT ³ at (m,y) ¹	No	ID	No	No	No	No	No	No	No	H	H30m	H>12m	No	IDB7y
Cause of death ⁴	Sepsis	Pneum	AW	AW	AW	AW	AW	Pneum	CMV	ADV	AW	AW	AW	AW

Deficiency	CD3δ																	
Family	1			2	3	4	5			6	7			8	9			
Ethnic background	Mennonites (Canada, USA, Germany)																	
Patient/sex	1F	2M	3M	4F	5M	6F	7M	8F	9M	10F	11F	12F	13M	14F	15M	16M	17M	18M
Consanguineous	Yes																	
Mutation (<i>leaky</i>) ⁷	Protein truncation																	
Diagnosis at (m) ¹	0	2	2	9	0	0	0	10	13	0	3	0	2	3	0	0	14	4
% CD3 ⁺ cells ²	0.3	0.1	0.6	2	0	0	1	0	27	1	<1	0	0	1.7	0.2	0	14	30
HSCT ³ at (m, y) ¹	MB4m	No	No	MB16m	MB4m	IDB1m	HP6m	HP12m	HB14m	HB2m	No	H	H	HP4m	MIC1m	MC1m	IDP23m	HP8m
Cause of death ⁴	AW	ADV	CMV	AW	AW	AW	GvHD	HHV6	CMV	AW	CMV	Asp	EBV	CMV	AW	AW	AW	CMV

1- m (months); y (years).

2- At diagnosis. Normal values 60–85%, includes dull and bright CD3⁺ cells.

3- First hematopoietic stem cell transplantation from related (matched = H) or unrelated (matched = M, mismatched = MI) donor bone marrow (B), peripheral blood (P) or cord blood (C).

4- AW (Alive and Well); ADV, CMV, EBV, HHV (viral infection); Pneum (Pneumonia); Asp (Aspergillus); GvHD (Graft vs Host Disease)

5- NR (Not reported).

6- For TCR α defects mostly TCR $\gamma\delta$ + T cells, few TCR $\alpha\beta$ ^{low} T cells.

7- Leaky refers to wild type protein levels. Skip7 (exon 7 skipping), Tr/Trunc (protein truncation), Het (compound heterozygote).

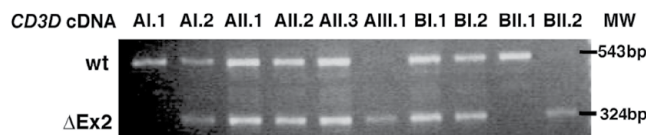
Table 3: Clinical and immunological characteristics of TCR deficient patients. Adapted from Mazariegos et al 2013.

sacáridos como las isoagglutininas y los anticuerpos heterófilos eran normales. A los 23 meses de edad se le realizó TPH idéntico y en la actualidad el paciente está sano y con valores normales de linfocitos T e inmunoglobulinas séricas.

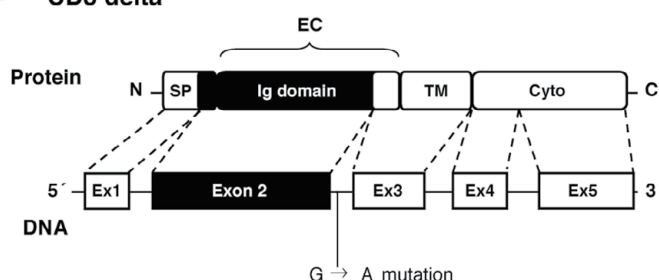
El segundo paciente, **BII.2**, ingresó en el Hospital Universitario La Paz a los 5 meses de edad con fiebre, diarrea, problemas respiratorios y linfopenia T. Los análisis mostraron infección por Citomegalovirus (CMV) y Adenovirus. Posteriormente se le diagnosticó enteropatía con pérdida de proteínas e hipogammaglobulinemia severa. La linfopenia T fue en aumento y la infección por CMV persistía. A los 8 meses se realizó un TPH que prendió inicialmente bien, 3 semanas post-trasplante fue admitido en cuidados intensivos con problemas respiratorios, inestabilidad hemodinámica, encefalopatía y fallo hepático. Falleció debido a un fallo multiorgánico debido a una infección sistémica por CMV (109, 118).

El análisis del DNA genómico de ambos pacientes mostró un cambio G>A en la posición +5 del intrón 2 (IVS2+5 G>A) de *CD3D*. Este cambio en el extremo dador 5' da lugar a un procesamiento alternativo del mRNA en el que se pierde el exón 2 (*CD3D* ΔEx2) que a nivel de proteína se corresponde con gran parte del dominio extracelular (fig. I14A y B). El análisis de las dos familias mostró que los progenitores eran portadores de la mutación (fig. I14C), y además se demostró que esta mutación no estaba presente en población sana ecuatoriana. El análisis por PCR cuantitativa de los transcritos mostró que en el 90% de los casos el procesamiento del mRNA daba lugar a *CD3D* ΔEx2 pero que en el 10% de los casos ocurría un procesamiento correcto de *CD3D* (fig. I14D).

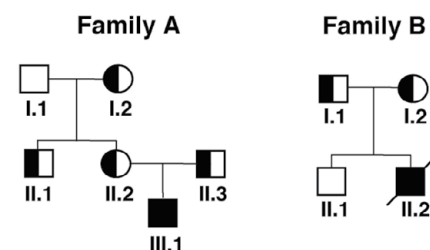
A RT-PCR Analysis



B CD3 delta



C



D

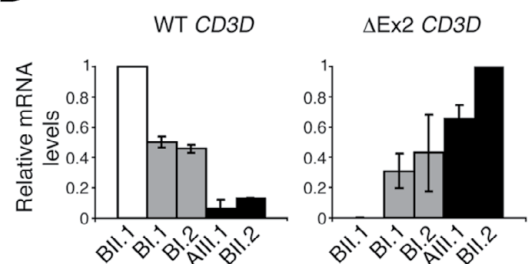


Figure I14: Partial *CD3D* mutation. **A:** *CD3D* RNA RT-PCR amplification products. ΔEx2 bands lack exon 2. **B:** *CD3δ* protein and gene structure with localization of the G→A mutation. SP: signal peptide; Ex: Exon. **C:** Genetic pedigrees. Circles indicate females; squares indicate males (slashes indicate deceased). Solid symbols denote homozygosity; half-solid symbols denote heterozygosity. **D:** WT and ΔEx2 *CD3D* transcript levels relative to *CD3E* by quantitative RT-PCR in PBMCs using exon-specific primers and isoform-specific probes. Adapted from Gil *et al* 2011.

06 /

Objetivos

06 / Objetivos

La gran homología existente entre las cadenas CD3 γ y CD3 δ del TCR contrasta con los dispares efectos clínicos que tienen las correspondientes inmunodeficiencias congénitas asociadas a la falta total de cada una de ellas (mucho más grave la segunda que la primera). Contra lo que cabría esperar, la falta parcial de CD3 δ descrita por nuestro grupo recientemente (apartado 4.2 de la introducción), se asoció también a una clínica muy grave, lo que sugiere un papel mucho más importante de CD3 δ , en comparación con CD3 γ , para el TCR o sus isoformas inmaduras. Fatalmente los modelos de ratón no recapitulan, sino que se oponen, a los defectos humanos, por lo que su estudio no arroja luz sobre la función de esas proteínas en humanos. De igual manera, el papel de ambas cadenas en el ensamblaje del TCR $\alpha\beta$ y el TCR $\gamma\delta$ resulta distinto en humanos y ratones. En este trabajo nos hemos propuesto tratar de entender las razones de dichas disparidades estudiando, por un lado, las consecuencias del silenciamiento selectivo de cada cadena en linfocitos T humanos maduros *in vitro*, y por otro los efectos de la deficiencia parcial congénita de CD3 δ *in vivo* y *ex vivo*. El objetivo general es avanzar en la definición del papel biológico de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en el ensamblaje, expresión y función del TCR, y en el desarrollo de los linfocitos T. Los objetivos concretos fueron dos:

1. Estudio de la deficiencia inducida (*knock down*) de CD3 γ o CD3 δ . Aún no se ha determinado con exactitud si las cadenas CD3 γ y CD3 δ son imprescindibles para la expresión del TCR. Diferentes estudios han llegado a conclusiones contradictorias, por lo que en este trabajo nos propusimos una nueva aproximación: su silenciamiento selectivo o KD en células maduras. Objetivos:

- 1.1. Generar líneas silenciadas estables para cada cadena.
 - 1.2. Estudiar el ensamblaje y maduración intracelular de sus TCR.
 - 1.3. Analizar la expresión en superficie de sus TCR.
 - 1.4. Analizar la señalización a través de sus TCR.
-

2. Estudio de la deficiencia congénita parcial de CD3 δ . En contraste con la total, que carece completamente de linfocitos T, la deficiencia parcial puede ser un excelente modelo para abordar el papel de CD3 δ en el desarrollo y función de los linfocitos T y en la expresión y señalización del TCR. Objetivos:

- 2.1. Estudiar el desarrollo de los linajes T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$.
 - 2.2. Analizar la expresión del TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$.
 - 2.3. Analizar la señalización a través del TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$.
-

07 /

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. SOFTWARE

TABLA M1: SOFTWARE	
PROGRAMA	APLICACIONES
Image Studio (LI-COR)	Adquisición y análisis de imágenes de WB
AxioVisionRel 4.7 (Zeiss)	Adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia
Cell Quest Pro (BD bioscience)	Adquisición de datos de citometría de flujo
Endnote X5 (Thomson Reuters)	Gestor bibliográfico
Excel (Microsoft)	Análisis de datos, estadística y diseño de gráficas
FlowJo (Tree Star)	Análisis de datos de citometría de flujo
GraphPad Prism (GraphPad)	Análisis de datos, estadística y diseño de gráficas
Illustrator CS4 (Adobe)	Diseño de figuras
ImageJ (Wayne Rasband, NIH)	Procesamiento de imágenes de microscopía de fluorescencia
InDesign CS4 (Adobe)	Maquetación y edición de texto
Photoshop CS4 (Adobe)	Edición de imagen

1.2. APARATOS, CONSUMIBLES Y KITS

TABLA M2: APARATOS, CONSUMIBLES Y KITS	
APARATO	EMPRESA
Odyssey® Fc	LI-COR
Citómetro de flujo FACScalibur	BD Bioscience
Irradiador Gammacell 1000	Nordion
Unidades de electroforesis	Bio-Rad
Unidades de transferencia	Bio-Rad
Microscopio de fluorescencia (AxioImager)	Zeiss
CONSUMIBLE	EMPRESA
Membranas de PVDF	Millipore
Placas de cultivo celular	Greiner-Bio
Puntas para micropipeta	Greiner-Bio
Pipetas de plástico	Greiner-Bio
Pipetas de vidrio	Greiner-Bio
Tubos	Greiner-Bio
Guantes	Sempercare
Jeringas	Becton-Dickinson
Portaobjetos 8 pocillos	Lab-Tek
Cubreobjetos (24mm x 60mm)	Menzel-Glaser

Filtros 0,45µm de acetato de celulosa	Millipore
Kit	Empresa
Miniprep Kit	Qiagen
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen

1.3. ANTICUERPOS

TABLA M3: ANTICUERPOS PRIMARIOS						
ESPECIFICIDAD	CLON	FLUOROCROMO	ESPECIE	ISOTIPO	APLICACIONES	ORIGEN
CD2	S 5.2	APC	Ratón	IgG1	CF	Becton Dickinson
CD3ε	UCHT1	PE-Cy5	Ratón	IgG1	CF	Beckman Coulter
CD3ε	UCHT1	---	Ratón	IgG1	A, IP, WB	eBioscience
CD3ε	OKT3	---	Ratón	IgG2a	A, IP, WB	eBioscience
CD3	S4.1	FITC	Ratón	IgG2a	CF	Molecular Probes
CD3	SK7	PE	Ratón	IgG1	CF	Becton Dickinson
CD3	HIT3A	APC	Ratón	IgG2a	CF	Becton Dickinson
CD3	MEM-57	---	Ratón	IgG2a	CF	AbD Serotec
CD3	F101.01	---	Ratón	IgG1	CF	Dr. B. Rubin
CD3δ	APA1/2	---	Ratón	IgG1	CFI, IP	Dr. B. Rubin
CD3δ	EP4426	---	Conejo	IgG	CFI, WB	Abcam
CD3δ	M20-CD3δ	---	Cabra	Policlonal	WB	Santa Cruz
CD3ε	M20-CD3ε	---	Cabra	Policlonal	WB	Santa Cruz
CD3γ	C20-CD3γ	---	Cabra	Policlonal	WB	Santa Cruz
CD3γ	EPR4517	---	Conejo	IgG	CFI, WB	Abcam
CD3ε	EPR5361(2)	---	Conejo	IgG	CFI, WB	Abcam
CD3γ	HMT3.2	---	Hámster	IgG2b	IP	Dr. R.T. Kubo
CD4	13B8.2	PE	Ratón	IgG1	CF	Beckman Coulter
CD8	B9.11	PE-Cy5	Ratón	IgG1	CF	Beckman Coulter
CD25	B1.49.9	FITC	Ratón	IgG2a	CF	Beckman Coulter
CD25	3G10	APC	Ratón	IgG1	CF	Molecular Probes
CD69	L-78	FITC	Ratón	IgG1	CF	Becton Dickinson
CD69	CH/4	APC	Ratón	IgG2a	CF	Molecular Probes
TCRαβ	BMA031	APC	Ratón	IgG2b	CF	Miltenyi
TCRαβ	WT31	FITC	Ratón	IgG1	CF	Becton Dickinson
TCRαβ	IP26	APC	Ratón	IgG1	CF	Biolegend
TCRγδ	IMMU510	FITC	Ratón	IgG1	CF	Beckman Coulter
TCRγδ	IMMU510	PE-Cy5	Ratón	IgG1	CF	Beckman Coulter
TCRγδ	11F2	PE	Ratón	IgG1	CF	Becton Dickinson
TCR Cβ1	JOVI-1	---	Ratón	IgG2a	CF, IP, IF	Dr. B. Alarcón
α-tubulina	B5-1-2	---	Ratón	IgG1	WB	Sigma-Aldrich
ζ	448	---	Conejo	Policlonal	WB, IF	Dr. B. Alarcón
Vβ3	CH92	FITC	Ratón	IgM	CF	Beckman Coulter
Vβ8	56C5	PE	Ratón	IgG2a	CF	Beckman Coulter
Vγ9	B3	PE	Ratón	IgG1	CF	Biolegend
Vδ1	TS8.2	FITC	Ratón	IgG1	CF	Thermo Scientific
Vδ2	B6	PerCP	Ratón	IgG1	CF	Biolegend

TABLA M4: ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	ESPECIE	APLICACIONES	ORIGEN
IgG (H+L) de cabra	IRDye680	Burro	WB	LI-COR
IgG (H+L) de conejo	PE	Cabra	CF	Beckman Coulter
IgG (H+L) de conejo	AF350	Cabra	IF	Invitrogen
IgG (H+L) de conejo	IRDye800	Burro	WB	LI-COR
IgG (H+L) de conejo	IRDye680	Cabra	WB	LI-COR
IgG (H+L) de ratón	FITC	Cabra	CF	Invitrogen
IgG (H+L) de ratón	PE	Cabra	CF	Beckman Coulter
IgG (H+L) de ratón	PE-Cy5.5	Cabra	CF	Beckman Coulter
IgG (H+L) de ratón	AF594	Burro	IF	Invitrogen
IgG (H+L) de ratón	IRDye800	Burro	WB	LI-COR
IgG (H+L) de ratón	IRDye680	Cabra	WB	LI-COR

1.4. PLÁSMIDOS

TABLA M5: PLÁSMIDOS		
NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ORIGEN
pLKO.1	Vector lentiviral para la expresión de shRNA bajo el promotor U6. Contiene resistencia a ampicilina, resistencia a puomicina y GFP y LTRs (Fig. M1)	Sigma-Aldrich
pMD2.G	Plásmido para proteínas de la envuelta (VSV-G)	Dra. M.L. Toribio
psPAX2	Plásmido empaquetador de segunda generación. Codifica para Gag y Pol	Dra. M.L. Toribio

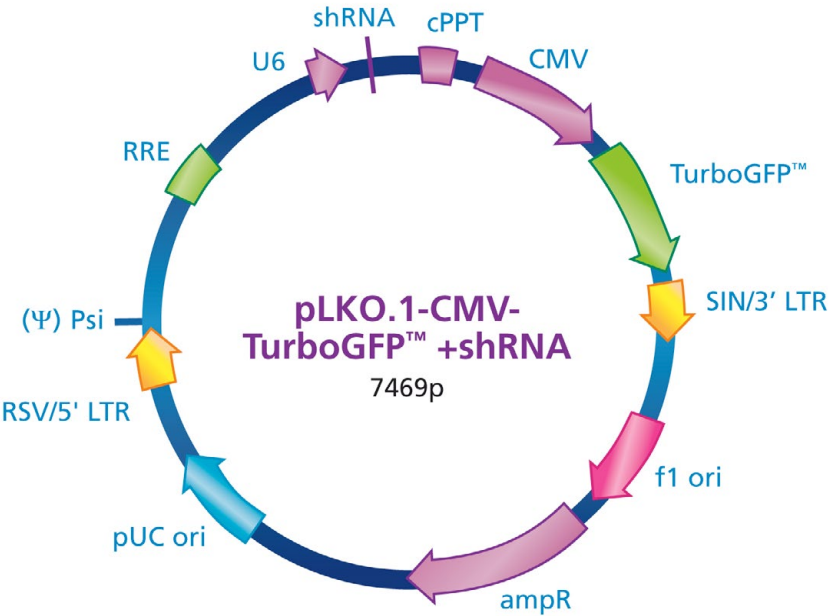


Fig. M1: pLKO.1 plasmid map. Contains a shRNA insert, puromycin selectable marker and turboGFP.

1.5. shRNA

Las secuencias shRNA empleadas en esta tesis para CD3 γ y CD3 δ son las publicadas por *The RNAi Consortium* (TRC) y se adquirieron a través de Sigma-Aldrich clonadas en el vector pLKO.1.

TABLA M6: SECUENCIAS shRNA		
shRNA	NÚMERO TRC	SECUENCIA (5'-3')
shNT	Non Target	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
shCD3 γ -1	TRCN0000057223	CGGCTTCCTAACTGAAGATAA
shCD3 γ -2	TRCN0000057224	CTGGCTATCATTCTTCTTCAA
shCD3 γ -3	TRCN0000057225	CAGAACTGCATTGAACTAAAT
shCD3 γ -4	TRCN0000057226	CCACCTTCAAGGAAACCAGTT
shCD3 γ -5	TRCN0000057227	GTATTACAGAATGTGTCAGAA
shCD3 δ -1	TRCN0000057218	GCATCCATTGAGATGATAATA
shCD3 δ -2	TRCN0000057219	CCGTGCAAGTTCATTATCGAA
shCD3 δ -3	TRCN0000057220	GAGGACAGAGTGTTTGTGAAT
shCD3 δ -4	TRCN0000057221	GTTGAGGAATGACCAGGTCTA
shCD3 δ -5	TRCN0000057222	CACTGCTCTCAGACATTACAA

1.6. REACTIVOS

TABLA M7: REACTIVOS	
REACTIVO	EMPRESA
Acrilamida	Sigma-Aldrich
Agar bacteriológico	Conda
Agarosa	Conda
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Antibiótico /antimicótico (penicilina G 100U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y amfotericina B 0,25 μ g/ml)	Gibco
Azida sódica (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Azul de tripano	Invitrogen
Biotina (sulfo-NHS-LC-biotina)	Thermo Scientific
BRIJ-97	Sigma-Aldrich
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Caldo soja tripticaseína	Conda
CFSE	Sigma-Aldrich
Cloruro Cálceo (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Cloruro Magnésico (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac
Digitonina	Sigma-Aldrich
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Panreac
Dynabeads proteína G	Invitrogen
EDTA	Panreac
Endoglicosidasa-H	Sigma-Aldrich
Etanol	Panreac

Extracto de levadura	Sigma-Aldrich
FCS	PAA Laboratories (ahora GE Healthcare)
Fibronectina	Sigma-Aldrich
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare
Fluoruro sódico (NaF)	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich
Glicina	Sigma-Aldrich
Glucosa	Sigma-Aldrich
Hepes	Gibco
Higromicina B	Sigma-Aldrich
IL-2 recombinante humana	Donada por Dr. Reynolds, Frederick Cancer Research and Development Center, NCI, NIH (USA)
IMDM	PAA Laboratories (ahora GE Healthcare)
Inhibidores de proteasas (cocktail set III)	Calbiochem
Ionicina	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Panreac
L-Glutamina	Gibco
Leche en polvo desnatada	Bio-Rad
Lenti-X™ Concentrator	Clontech
Lipofectamina	Invitrogen
Lowry D _C Protein Assay	Bio-Rad
Medio de montaje con DAPI (Vectashield®)	Vector Laboratories
Metanol	Gerber-Labo
Opti-MEM	Gibco
Panserin	Pan-Biotech
Paraformaldehído	Panreac
PBS	Gibco
Persulfato de amonio (APS)	Bio-Rad
Pervanadato sódico (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
PHA	Sigma-Aldrich
Plus Reagent	Invitrogen
PMA (Acetato de forbol miristato)	Sigma-Aldrich
Polibreno (Bromuro de hexadimetrina)	Sigma-Aldrich
Puomicina	Sigma-Aldrich
Reactivo de bloqueo (microscopía)	Roche
RPMI 1640	Lonza
SDS	Sigma-Aldrich
Suero Humano AB ⁺	Centro de transfusiones CAM
Sulfato magnésico (MgSO ₄)	Panreac
Tampón de carga 2X reductor para WB	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris (tris(hidroximetil)aminometano)	Sigma-Aldrich
Triton®X-100	Thermo Scientific
Tween 20	Sigma-Aldrich
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

1.7. MEDIOS, TAMPONES Y SOLUCIONES

TABLA M8: MEDIOS, TAMPONES Y SOLUCIONES		
NOMBRE	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
IMDM completo	10% Suero Humano AB ⁺ 1% antibiótico /antimicótico 2mM L-Glutamina 10mM Hepes 40 UI/ml IL-2 recombinante humana	Cultivos celulares
LB	1% Caldo soja tripticaseína 0,5% Extracto de levadura 1% NaCl	Crecimiento de bacterias
LB-agar-ampicilina	LB 1,4% Agar Bacteriológico 100µg/ml ampicilina	Crecimiento de bacterias
LB-ampicilina	LB 100µg/ml ampicilina	Crecimiento de bacterias
Medio de congelación celular	10% DMSO 45% RPMI 45% FCS	Cultivos celulares
Medio de congelación para bacterias (2x)	25 mM TRIS HCl pH 8 0,1 M MgSO ₄ (x7 H ₂ O) 65% Glicerol	Crecimiento de bacterias
PBS-BSA	PBS 0,1% BSA 0,05% Azida sódica	Citometría de Flujo
PBS-T	PBS 0,01% Tween20	Western Blot
RPMI completo	10% FCS 1% antibiótico /antimicótico 2mM L-Glutamina 10mM Hepes	Cultivos celulares
RPMI:Panserin completo	RPMI:Panserin (proporción 1:1) 10% FCS 1% antibiótico /antimicótico 2mM L-Glutamina 10mM Hepes 40 UI/ml IL-2 recombinante humana	Cultivos celulares
SOC	2% Caldo soja tripticaseína 0,5% Extracto de levadura 0,05% NaCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glucosa	Transformación de bacterias
Tampón de electroforesis	25 mM Tris 192 mM Glicina 0,1% SDS	SDS-PAGE
Tampón de lisis (Brij96V)	0,3% Brij96V 20 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 10% Glicerol 4 mM EDTA 1 mM PMSF 2 mM Na ₃ VO ₄ 10 mM NaF 1x inhibidores de proteasas	Preparación de extractos celulares

Tampón de lisis (NP40)	1% NP-40 50 mM Tris-HCl pH 7.4 100 mM NaCl 10% Glicerol 2 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 25 mM NaF 1x inhibidores de proteasas	Preparación de extractos celulares
Tampón de transferencia	25 mM Tris 192 mM Glicina 20% Metanol	SDS-PAGE
Gel separador	10-18% Acrilamida 0,1% SDS 375mM TRIS 0,1% APS 0,04% Temed	SDS-PAGE
Gel concentrador	4,5% Acrilamida 0,1% SDS 125mM TRIS 0,1% APS 0,1% Temed	SDS-PAGE
TBS	150mM NaCl 20mM Tris pH 7,5	Inmunofluorescencia
TNB	TBS 0,5% reactivo bloqueo	Inmunofluorescencia

1.8. CÉLULAS

TABLA M9: CÉLULAS		
NOMBRE	DESCRIPCIÓN	MEDIO DE CRECIMIENTO
GUS-1	Línea B transformada con EBV	RPMI completo
HEK-293T	Células embrionarias de riñón humano (ATCC#CRL-11268)	RPMI completo
HPB-ALL	Linfoma T humano (DZMZ# ACC 483)	RPMI completo
Jurkat E6-1	Linfoma T humano (ATCC#TIB-152)	RPMI completo
Jurkat CH7C17	Expresan TCR α (V α 1.4) y TCR β (V β 3.1) exógenos (119)	RPMI completo + higromicina B (400 μ g/ml) + puomicina (2 μ g/ml)
Líneas HVS	Linfocitos T inmortalizados con <i>Herpesvirus saimiri</i> (HVS)	RPMI:Panaserin completo
Linfocitos T primarios	Extraídos de sangre periférica	IMDM completo

2. Métodos

2.1. BIOQUÍMICA

2.1.1. LISADOS TOTALES E IMMUNOPRECIPITACIÓN

Para obtener los extractos celulares, se lavaron las células en PBS y se lisaron en el tampón de lisis correspondiente durante 30min en hielo. Para las co-inmunoprecipitaciones (co-IP) se utilizó siempre el tampón de lisis que contiene Brij96V. Posteriormente se centrifugaron los extractos a 30.000g durante 15min a 4°C, para eliminar los restos de membranas. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Lowry.

Para las inmunoprecipitaciones (IP) se utilizaron microesferas magnéticas (*Dynabeads*) unidas a proteína G. Las separaciones se realizaron con la ayuda de un imán (*Dynamag*). En primer lugar, se incubaron las *Dynabeads* con 2μg de anticuerpo durante 10min a TA y en rotación. Tras la unión del anticuerpo se lavaron las *Dynabeads* con PBS-T y se incubaron con 2mg de los extractos celulares durante 1h a 4°C con rotación. Posteriormente se lavaron las *Dynabeads* 3 veces con PBS-T y se resuspendieron en tampón de carga para WB.

2.1.2. DESGLICOSILACIÓN

Tras la IP, en algunos casos se desgllicosilaron los inmunoprecipitados con Endoglicosidasa-H (EndoH). Se incubaron las *Dynabeads* con tampón desnaturalizante (contiene SDS y β-mercaptoetanol) durante 2min a 95°C, se enfriaron las muestras en hielo y se añadieron 2μl de la enzima. La mezcla se incubó 3h a 37°C. Tras la desgllicosilación se resuspendieron las *beads* en tampón de carga no reductor y se analizaron las muestras por WB.

2.1.3. SDS-PAGE Y WB

En el caso de los lisados totales, se cargaron 40μg de proteína por calle, y en el caso de las inmunoprecipitaciones 1/3 del precipitado. Las muestras se mezclaron con tampón de carga para WB y se incubaron 5min a 95°C si el tampón era reductor o 10min a 65°C en el caso del tampón no reductor.

Las muestras fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se prepararon geles a distintos porcentajes (12-18%) de acrilamida dependiendo del experimento y del tamaño de la proteína de interés. Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF mediante transferencia semi-seca.

Las proteínas de interés se detectaron por inmunoblot: en primer lugar se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las membranas con PBS 5% leche o BSA, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario, se lavó con PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario, se lavó y se reveló. Las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo en PBS 0,5% leche o BSA. Para el revelado de las membranas se usaron anticuerpos secundarios unidos a HRP o unidos a fluorocromos, en el caso de los secundarios-HRP se reveló usando reactivo ECL.

2.2. BIOLOGÍA MOLECULAR

2.2.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Se utilizaron bacterias competentes XL-1 Blue (Stratagene). Se añadieron 0,85μl de mercaptoetanol a 50μl de bacterias y se incubó en hielo 10min

Se añadieron 20ng de plásmido (contiene gen de resistencia a ampicilina) y se incubó en hielo 30min, posteriormente 45s a 42°C y por último 2min en hielo. Sobre la mezcla se añadieron 450µl de SOC (precalentado a 42°C) y se incubó 1h a 37°C con agitación (250rpm). Se sembraron distintas cantidades de bacterias en placas de LB-ampicilina y al día siguiente se picaron colonias aisladas.

2.2.2. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Las colonias transformadas se crecieron en 3ml de LB-ampicilina, tras 8h se lisaron bacterias y se aisló el DNA plasmídico mediante MINIPREP. En caso de contener el plásmido, el resto de bacterias se crecieron durante 16h en 500ml de LB-ampicilina, se lisaron y se purificó el plásmido por MAXIPREP en condiciones libres de endotoxinas. La cantidad y calidad de los plásmidos se valoró en gel de agarosa al 0,8% y por absorbancia a 260nm.

2.2.3. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS

LENTIVIRALES

Para generar las partículas lentivirales, se transfectaron transitoriamente células HEK-293T mediante lipofección con los 3 plásmidos necesarios, pMD2G que contiene los genes virales necesarios para la síntesis de las proteínas de la envuelta (VSV-g), psPAX2 que contiene los genes gag y pol necesarios para el empaquetamiento y el plásmido pLKO.1 que porta el resto de genes víricos, así como genes de interés (GFP, resistencia a ampicilina y resistencia a puromicina) y la secuencia shRNA.

La transfección se realizó en placas de 100mm de diámetro, utilizando células sembradas el día anterior, con bajo número de pases y a 70-80% de confluencia. Previo a la transfección se renovó el medio de cultivo por 8ml de medio fresco. La mezcla de plásmidos y el reactivo lipídico (Lipofectamina) se prepararon del siguiente modo:

TUBO A:

600µl Opti-MEM
96µl Plus Reagent
Plásmidos (4,8µg psPAX2+6,6µg pLKO.1
+1,44µg pMD2G)

TUBO B:

600µl Opti-MEM
24µl Lipofectamina

Ambos tubos se incubaron durante 15min a TA, posteriormente se mezclaron y se volvió a incubar 15min a TA. La mezcla de plásmidos y lipofectamina se añadió sobre las células HEK-293T gota a gota. Tras 24h se retiró el medio y se añadieron 5ml de RPMI completo. 48h después de la transfección se recogió el sobrenadante rico en partículas virales y se añadieron otros 5ml de RPMI completo, a las 72h se volvió a recoger sobrenadante, se levantaron las células con PBS y se analizaron por citometría de flujo para observar la expresión de GFP, que nos da una idea de la eficiencia de la transfección (fig. M2).

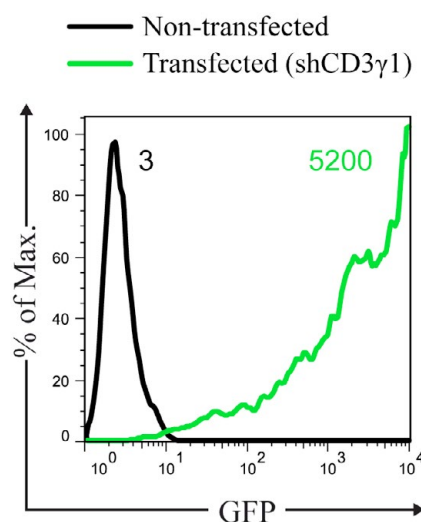


Fig. M2: Representative transfection of HEK-293T cells. GFP expression of packaging cells (HEK-293T) after co-transfection with pLKO.1 vector and packaging plasmids. Cells were co-transfected during 24h with the 3 plasmids required for the production of lentiviral particles. Transfection efficiency was determined by GFP expression 72h post-transfection in transfected (green) vs non-transfected cells (black). Numbers indicate geoMFI of GFP.

Los sobrenadantes cargados de partículas víricas se filtraron con filtros de 0,45µm para eliminar restos celulares. Posteriormente se concentraron los virus añadiendo 1,5ml del reactivo *Lenti-X Concentrator*, se incubó 30min a 4°C y seguidamente se centrifugó a 1.500g, a 4°C durante 45min. El pellet rico en virus se resuspendió en 200µl de PBS, se alicuotó y congeló a -80°C.

2.3. BIOLOGÍA CELULAR

2.3.1. CULTIVOS CELULARES

Las distintas líneas celulares se crecieron en su medio de crecimiento habitual bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C y 5% CO₂).

2.3.2. OBTENCIÓN DE LÍNEAS KD

Para generar las distintas líneas KD se utilizaron shRNA específicos para las cadenas CD3 γ y CD3 δ . La tecnología del RNA de interferencia (RNAi) permite silenciar específicamente un gen con relativa facilidad. Los shRNA, son RNAi en forma de horquilla que una vez introducidos en la célula diana son procesados a RNA de cadena sencilla. El complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) reconoce los RNA de cadena sencilla y juntos se unen el mRNA complementario al shRNA degradándolo o impidiendo su traducción (120).

Como vehículo para introducir los shRNA se usaron vectores lentivirales, que permiten altas eficiencias de transducción y un silenciamiento estable ya que el DNA viral se incorpora al genoma de la célula diana.

Previamente a la infección, se titularon las partículas víricas mediante diluciones seriadas. Se eligió el título al que se conseguía mayor porcentaje de células infectadas, determinadas por la expresión de GFP, pero sin que llegara a ser tóxico, determinado como el % de células vivas (fig. M3).

Todas las infecciones se realizaron en el mismo medio de crecimiento de la línea a infectar y a una concentración de 100.000 células/ml. Se añadió la cantidad adecuada de partículas víricas suplementadas con un polímero catiónico que neutraliza la repulsión entre los viriones y las células (Polibreno a 8mg/ml para Jurkat y PBL, y a 2mg/ml para la línea HPB-ALL). Posteriormente se sembraron en placas y se centrifugaron a 600g durante 45min a TA con el objetivo de facilitar la interacción virus-célula. Tras la centrifugación se incubaron las células durante 24h a 37°C, posteriormente se lavaron y se crecieron en su medio de cultivo habitual. Tres días después de la infección se añadió al medio de cultivo 2 μ g/ml de puomicina para eliminar las células no infectadas. La eficiencia de la infección se valoró por citometría de flujo analizando la expresión de GFP.

Para infectar PBL fue necesario un paso previo de activación. Dos días antes de la infección, las células se activaron con 1 μ g/ml de PHA y 40UI/ml de IL-2.

2.3.3. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DEPENDIENTES DE FEEDER E IL-2

Se aislaron PBMC mediante gradiente de densidad, para ello se diluyó la sangre 1:1 con RPMI, la mezcla se vertió cuidadosamente sobre 1 volumen de Ficoll-Paque™ y se centrifugó 30min a TA y a una velocidad de 400g (sin aceleración y sin freno). Tras la centrifugación se recogió la banda que flota sobre el Ficoll (PBMC). Las células obtenidas se lavaron dos veces con PBS para eliminar restos de Ficoll.

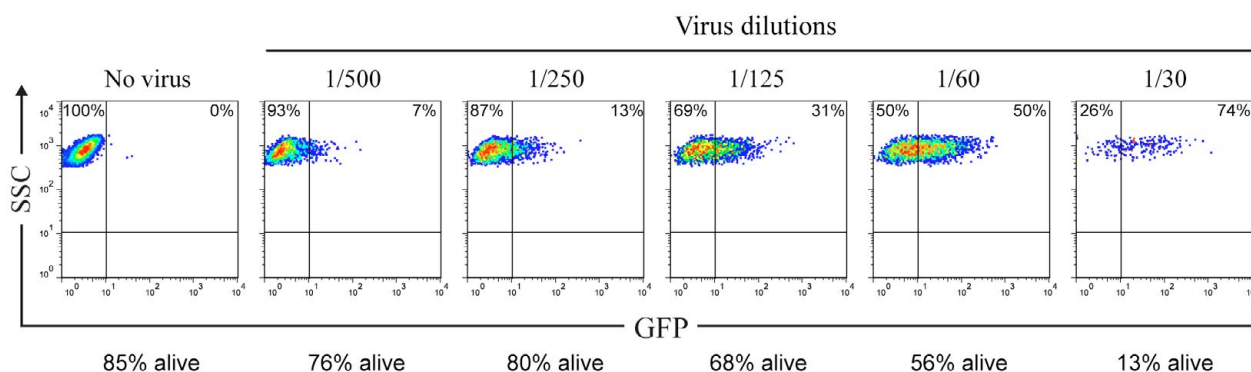


Fig. M3: Representative virus titration. GFP expression was analyzed in Jurkat cells 4 days after transduction. In this representative experiment the dilution chosen was 1/60. Numbers indicate percentage of GFP⁺ vs GFP⁻ cells.

Posteriormente se sembraron 0,01 millones de PBMC en placas de 96 pocillos de fondo redondo en medio IMDM completo (contiene IL-2) al que se añadió 1µg/ml de PHA (sólo a día 0). Las células se estimularon semanalmente con 0,1 millones de células alogénicas (*feeder*). Las células *feeder* se prepararon mezclando 1:1 PBMC de un donante distinto a las células a expandir y células B transformadas con EBV (GUS-1), se irradiaron a 40Gy las PBMC y 65Gy la línea GUS-1. Los clones obtenidos a partir de estas líneas se generaron por dilución límite y también fueron estimulados semanalmente.

2.3.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

En todos los experimentos de citometría de flujo se analizó según el tamaño y la complejidad la región de células de interés; en el caso de PBMC se acotó a la región de linfocitos y en el caso de líneas celulares a la región de células vivas. En todos los casos se usaron los controles de isotipo adecuados para determinar la tinción basal, que se indica en los histogramas como una línea vertical y en los gráficos de puntos como una cruz; estas líneas marcan el límite superior del control de isotipo. La medida de intensidad de fluorescencia que se usa en esta tesis es la media geométrica (geoMFI).

Marcaje extracelular: Se tomaron $0,2-0,3 \times 10^6$ células/marcaje y se lavaron en 200µl de PBS-0,5% BSA. Las tinciones se realizaron en un volumen final de 25µl y con la cantidad adecuada de cada anticuerpo; el anticuerpo se incubó 15min a 4°C, se lavó con PBS-0,5% BSA y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. En el caso de anticuerpos primarios no conjugados, fue necesaria una segunda incubación con un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo.

Marcaje intracelular: Se utilizaron $0,3-0,4 \times 10^6$ células/marcaje, se lavaron en 200µl de PBS-0,5% BSA y se fijaron 30min a 4°C en 200µl de PFA al 2%. Tras la fijación se lavaron las células y se permeabilizaron con saponina a 0,2% en PBS durante 15min a RT, posteriormente se volvió a lavar y se procedió a las incubaciones con los anticuerpos, siempre en presencia de saponina.

2.3.5. ANÁLISIS FUNCIONAL

Inducción de CD69 y CD25: Como medida de activación celular se utilizó la inducción de la expresi-

ón en membrana de las proteínas CD69 y CD25. Como estímulo se utilizó anti-CD3 (UCHT-1) pegado a plástico: se diluyó el anticuerpo en PBS a 10µg/ml, se repartieron 100µl a cada pocillo de una p96 y se incubó a 37°C durante 1h para que el anticuerpo se uniese al plástico. Posteriormente se lavaron los pocillos con PBS y se añadieron 200µl de células en RPMI completo a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se incubaron las células en presencia o ausencia del anticuerpo durante 24h para el análisis de la inducción de CD69 y durante 36h para CD25. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS y se analizó la expresión de estas dos moléculas por citometría de flujo extracelular.

Internalización y re-expresión del TCR: Para los ensayos de internalización del TCR se estimularon las células con anti-CD3 (UCHT-1 a 10µg/ml) pegado a plástico durante 24h y tras la estimulación se valoró la expresión del TCR por citometría de flujo, comparando células estimuladas con células sin estimular. La cinética de re-expresión del TCR se determinó analizando la expresión del TCR tras la internalización a diferentes tiempos. Para ello, tras las 24h de estimulación se lavaron las células con PBS y se mantuvieron en cultivo 4 días para cada 24h analizar por citometría de flujo la expresión del TCR.

2.3.6. INMUNOFLOURESCENCIA

Para las inmunofluorescencias se utilizaron portaobjetos con 8 pocillos. En primer lugar se trataron los cristales con fibronectina (FN) para que las células pudiesen adherirse al cristal. Se incubó 30min a 37°C con 50µg/ml de FN en PBS, se lavó con PBS, se añadieron 80.000 células/pocillo y se incubó 30min a 37°C para permitir la adhesión de las células al cristal. Posteriormente se retiró el líquido y se fijó con PFA al 4% 5min a RT y en oscuridad. Se lavó 3 veces en TBS (5min cada lavado) y se permeabilizó con Triton®X-100 al 0,1% en TBS 5min a RT. Posteriormente se bloqueó 30min en TNB a RT y se incubó 1h a RT con el anticuerpo primario. Tras la incubación se lavó 3 veces con TBS y se incubó con el anticuerpo secundario 30min a RT. Por último se volvió a lavar y se montaron las preparaciones con medio de montaje con DAPI, se dejaron secar toda la noche y se analizaron en el microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo de 40X.

08 /

Resultados

1. Deficiencia inducida de CD3γ o CD3δ (Knock-Down)

1.1. OBTENCIÓN DE LÍNEAS JURKAT KD PARA CD3γ O CD3δ

Para el estudio del ensamblaje del TCR en ausencia de CD3γ o CD3δ se generaron líneas Knock Down (KD) para estas dos proteínas. Se infectaron células Jurkat con lentivirus que portaban secuencias shRNA específicas para la cadena CD3γ (shCD3γ) o CD3δ (shCD3δ). Se probaron 5 secuencias shRNA diferentes para cada una de las cadenas y una secuencia control (*Non Target*, shNT) que no es complementaria de ningún gen humano ni de ratón. Se comprobó por WB la eficiencia de las distintas secuencias shRNA para silenciar la expresión de las cadenas en comparación con el shRNA control (shNT) utilizando anticuerpos específicos para CD3γ o CD3δ (fig. R1.1).

La cuantificación de la cantidad de cada cadena relativa al control de carga (α -tubulina) mostró que algunos shRNA no tenían efecto, como por ejemplo el shCD3δ-1, otros tenían un efecto intermedio, shCD3γ-3 y otros bloqueaban con mucha eficiencia la expresión de la proteína. Se eligieron los shRNA que producían mayor KD, es decir, shCD3γ-1 y shCD3δ-3. Con estos shRNA se generaron líneas KD estables resistentes a puromicina con las que se realizaron los estudios de expresión y ensamblaje.

Una vez establecidas las líneas KD estables con los shRNA más eficaces, se analizó el grado de silenciamiento y el efecto de éste sobre la expresión del resto de cadenas CD3 en al menos 10 experimentos

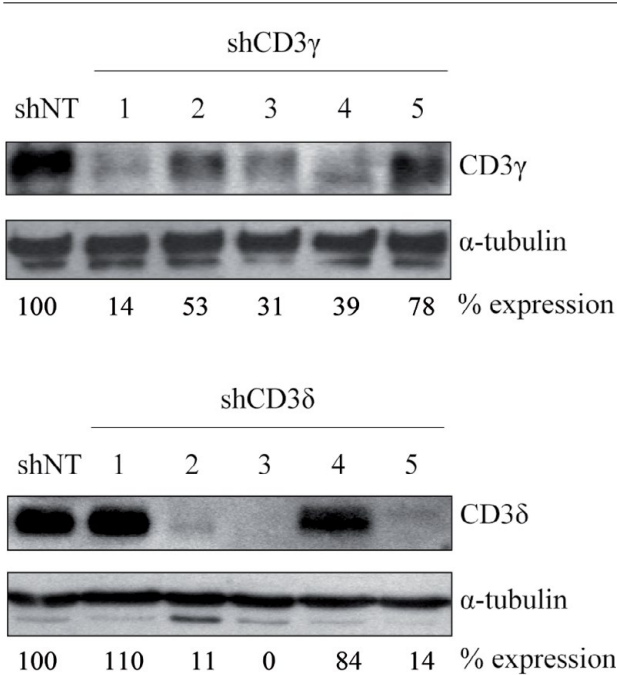


Figure R1.1: shRNA sequence screening. Jurkat cells were transfected with 5 different shRNA for CD3γ, 5 for CD3δ and 1 Non Target shRNA (shNT). After 7 days in culture, cells were lysed in NP40 buffer, 40μg of total protein were loaded in SDS-PAGE gels, transferred into PVDF membranes and developed with antibodies against α -tubulin (Sigma), CD3γ (Santa Cruz) or CD3δ (Santa Cruz). Band signal intensity was analyzed with Image Studio software. Numbers below each panel indicate the percentage of chain expression relative to shNT normalized to the loading control (α -tubulin).

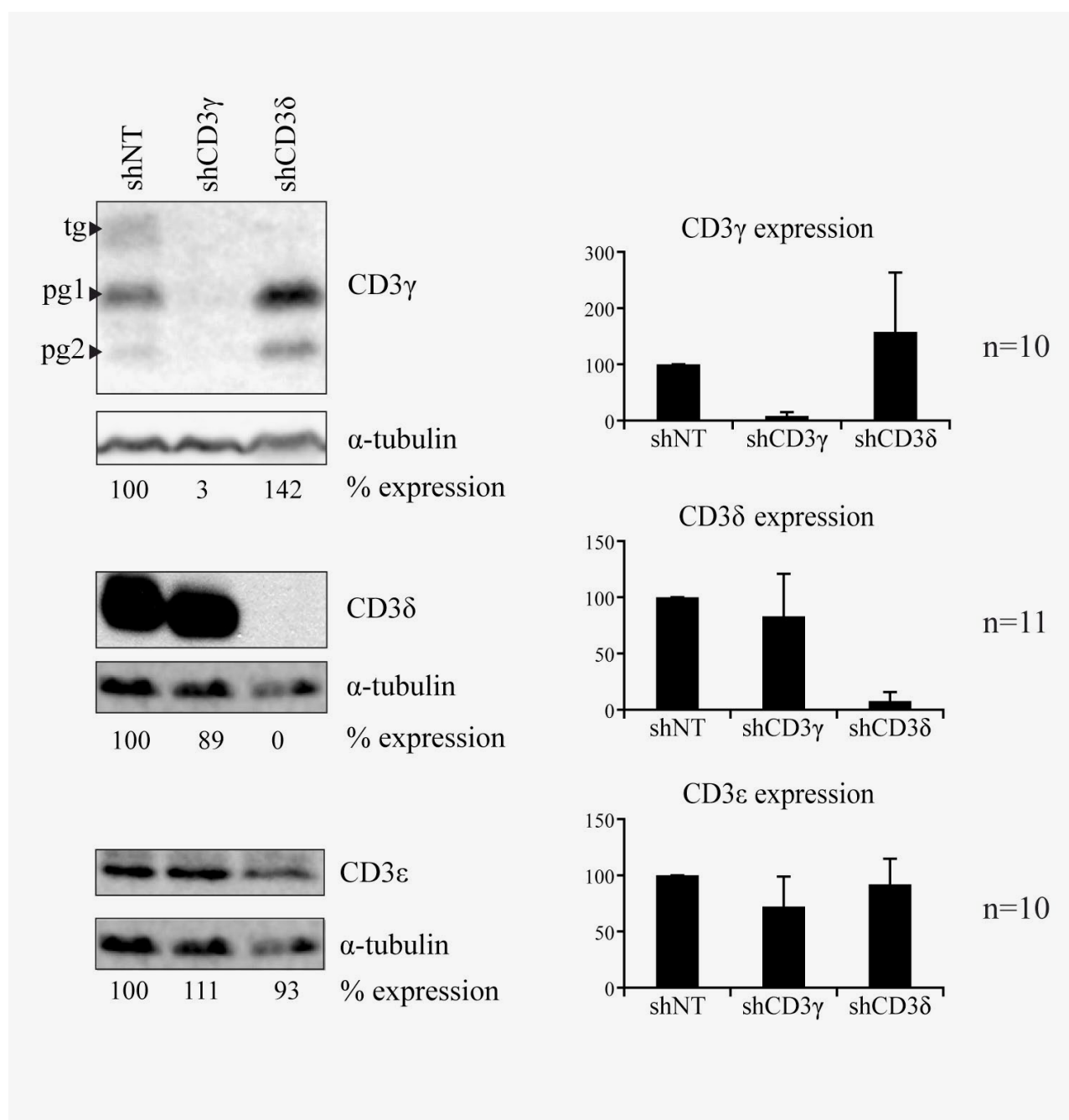


Figure R1.2: CD3 expression in Jurkat KD cell lines. Jurkat cells were transfected with shCD3γ-1, shCD3δ-3 and shNT. After several days in culture with puromycin, cells were lysed in NP40 buffer, 40µg of total protein were loaded in SDS-PAGE gels, transferred into PVDF membranes and developed with antibodies against α-tubulin (Sigma), CD3γ (Abcam) CD3δ (Santa Cruz) or CD3ε (Abcam). Band analysis and numbers as in Fig. R1.1. **Left:** A representative experiment. **Right:** quantification of at least 10 different experiments, data are mean values + SD.

independientes (fig. R1.2). Los resultados muestran que el silenciamiento obtenido en las líneas shCD3 γ y shCD3 δ es casi del 100%.

El análisis de la expresión del resto de cadenas cuando se silenciaba una de ellas mostró que en las células tratadas con shCD3 γ (de ahora en adelante línea shCD3 γ), los niveles de CD3 δ y CD3 ϵ disminuían ligeramente (83% y 72% respectivamente). Sin embargo, en las células tratadas con shCD3 δ (de ahora en adelante línea shCD3 δ) los niveles de CD3 ϵ disminuían (84%), mientras que los niveles de CD3 γ aumentaban (158%).

El análisis de la expresión de CD3 γ por WB revela (en células control) 3 bandas que corresponden (de mayor a menor tamaño) con la forma totalmente glicosilada (tg) y dos formas parcialmente glicosiladas (pg1 y pg2). La línea shCD3 δ carecía de CD3 γ -tg que es la forma más madura y la que se expresa en membrana, pero sin embargo se observaba un acúmulo de las formas pg, por tanto estos resultados sugieren que en ausencia de CD3 δ , la cadena CD3 γ no

alcanza la superficie celular. El aumento en los niveles de CD3 γ en la línea shCD3 δ también se observó por citometría de flujo intracelular (fig. R1.3). Estos datos sugieren que en ausencia de CD3 δ la cadena CD3 γ queda retenida en un compartimento intracelular donde es relativamente estable.

1.2. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL TCR EN MEMBRANA

Una vez establecidas las líneas y comprobado el KD, se estudió la expresión en superficie del TCR siguiendo dos estrategias, citometría de flujo extracelular y microscopía de fluorescencia.

El análisis por citometría de flujo extracelular utilizando un amplio panel de mAb frente a las cadenas TCR o CD3 (BMA031, Hit3A, UCHT-1, V β 8 and SK7) reveló que ninguno de los epítomos reconocidos por estos mAb se expresaba en la superficie de las células KD (fig. R1.4 paneles centrales e inferiores). Sin embargo, estas líneas expresaban cantidades similares de CD2 y HLA clase I en comparación con la línea shNT.

Para descartar que la pérdida de una de las cadenas estuviese afectando al sitio de reconocimiento de estos mAb, comparamos su patrón de unión a las líneas Jurkat KD con la línea celular HVS deficiente en CD3 γ ($\gamma^{-/-}$). Los linfocitos T HVS generados a partir de células de un paciente deficiente en CD3 γ (paciente 5 en la tabla I.3) son capaces de expresar el TCR en su membrana pese a la ausencia de CD3 γ , aunque siempre en menor medida que las células control (fig. R1.4 paneles superiores). Como ya se comentó en la introducción, la estequiometría de las cadenas invariantes en el TCR es $(\delta\epsilon)(\gamma\epsilon)(\zeta)_2$, sin embargo, las células $\gamma^{-/-}$ expresan un TCR con estequiometría $(\delta\epsilon)_2(\zeta)_2$. Este cambio de estequiometría altera ciertos epítomos del TCR, de modo que la unión de algunos anticuerpos se ve más afectada que otros. Por ejemplo, el epítomo reconocido por el anticuerpo BMA031 se ve muy afectado por el cambio de estequiometría, mientras que el reconocido por el anticuerpo SK7 se ve menos afectado. Estas diferencias epitópicas en el TCR de las células $\gamma^{-/-}$

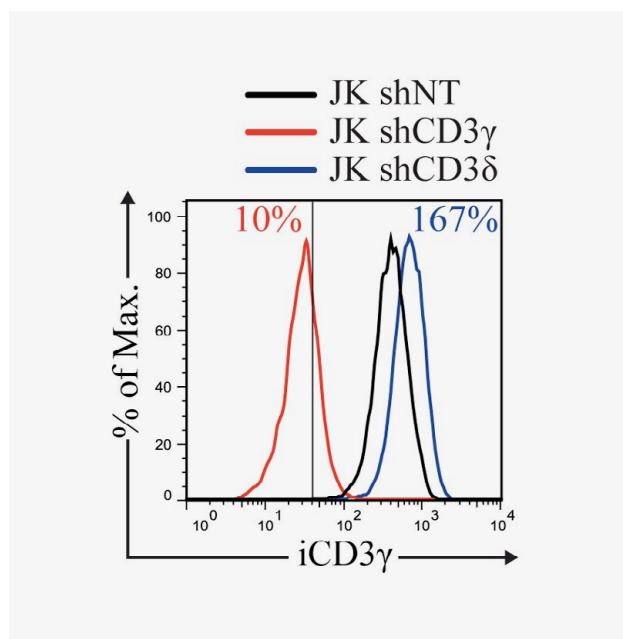


Figure R1.3: Comparative intracellular CD3 γ expression. Cells were fixed with PFA and permeabilized with saponin and stained with anti-CD3 γ (Abcam) followed by a secondary fluorescent antibody (anti-rabbit PE). Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Vertical lines indicate the upper limit staining of the isotype control. Numbers indicate percentage of expression vs control (shNT).

han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo y se han observado tanto en las líneas HVS como en células frescas (80).

Sin embargo, en las líneas Jurkat shCD3 γ y shCD3 δ no se observó expresión del TCR con ninguno de los 5 mAb anti-CD3 y anti-TCR utilizados, sugiriendo que la línea celular Jurkat, a diferencia de los linfocitos T de pacientes deficientes de CD3 γ , no es capaz de alterar la estequiometría de su TCR para expresarlo con cadenas invariantes ($\delta\epsilon$)₂(ζ)₂ o ($\gamma\epsilon$)₂(ζ)₂

y que la bajada de expresión no es atribuible a una posible desaparición de los epítomos reconocidos por los mAb empleados.

En segundo lugar, y para corroborar el resultado obtenido, se analizó la expresión intracelular y extracelular de la cadena TCR β por microscopía de fluorescencia (fig. R1.5). Para ello se marcaron células permeabilizadas y sin permeabilizar con anti-TCR β y se analizaron los resultados en el microscopio de fluorescencia.

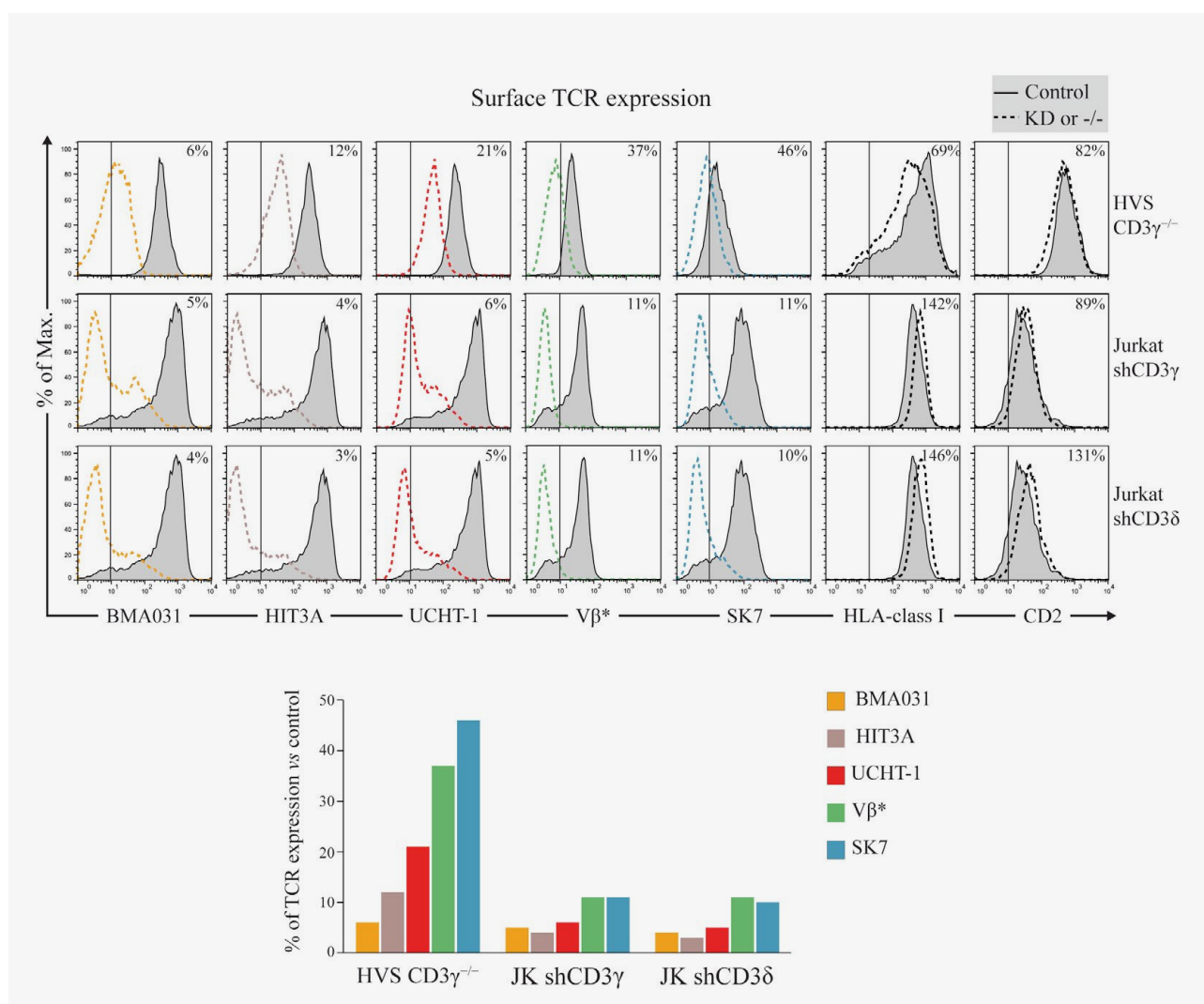


Figure R1.4: Surface TCR expression by flow cytometry.

Top: Cells were stained with labelled TCR/CD3-specific mAb (BMA031, HIT3A, UCHT-1, V β and SK7) or with TCR-independent control mAb (anti-HLA-class I and -CD2). Expression was analyzed in HVS-CD3 $\gamma^{-/-}$, Jurkat shCD3 γ and Jurkat shCD3 δ cells (dashed lines) relative to their relevant controls (HVS-CD3 $\gamma^{-/-}$ or Jurkat shNT, solid lines). The vertical line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb. The numbers in each histogram indicate geoMFI ratios (x100) relative to controls. **Bottom:** bar representation of TCR/CD3 geoMFI ratios relative to controls. *V β 3- or V β 8-specific mAb were used for HVS or Jurkat cells, respectively.

Los resultados mostraron que tanto las células control (shNT) como las KD expresaban la cadena TCR β a nivel intracelular (células permeabilizadas). Sin embargo, al analizar la expresión de esta cadena a nivel extracelular (células sin permeabilizar), sólo se observó tinción en las células control. Estos resultados indican los 3 tipos celulares expresan la cadena TCR β a nivel intracelular, pero que en las células shCD3 γ y shCD3 δ la cadena TCR β , y por consiguiente el TCR, no alcanza la superficie celular.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo extracelular y microscopía de fluorescencia nos permiten concluir que la ausencia de CD3 γ o CD3 δ en la línea celular Jurkat impide la expresión del TCR en la superficie celular.

Seguidamente quisimos comprobar que la pérdida de expresión del TCR observada en las líneas KD se debía al efecto específico del silenciamiento, para ello se estudió la expresión del TCR en superficie en células transducidas con todas las secuencias shR-

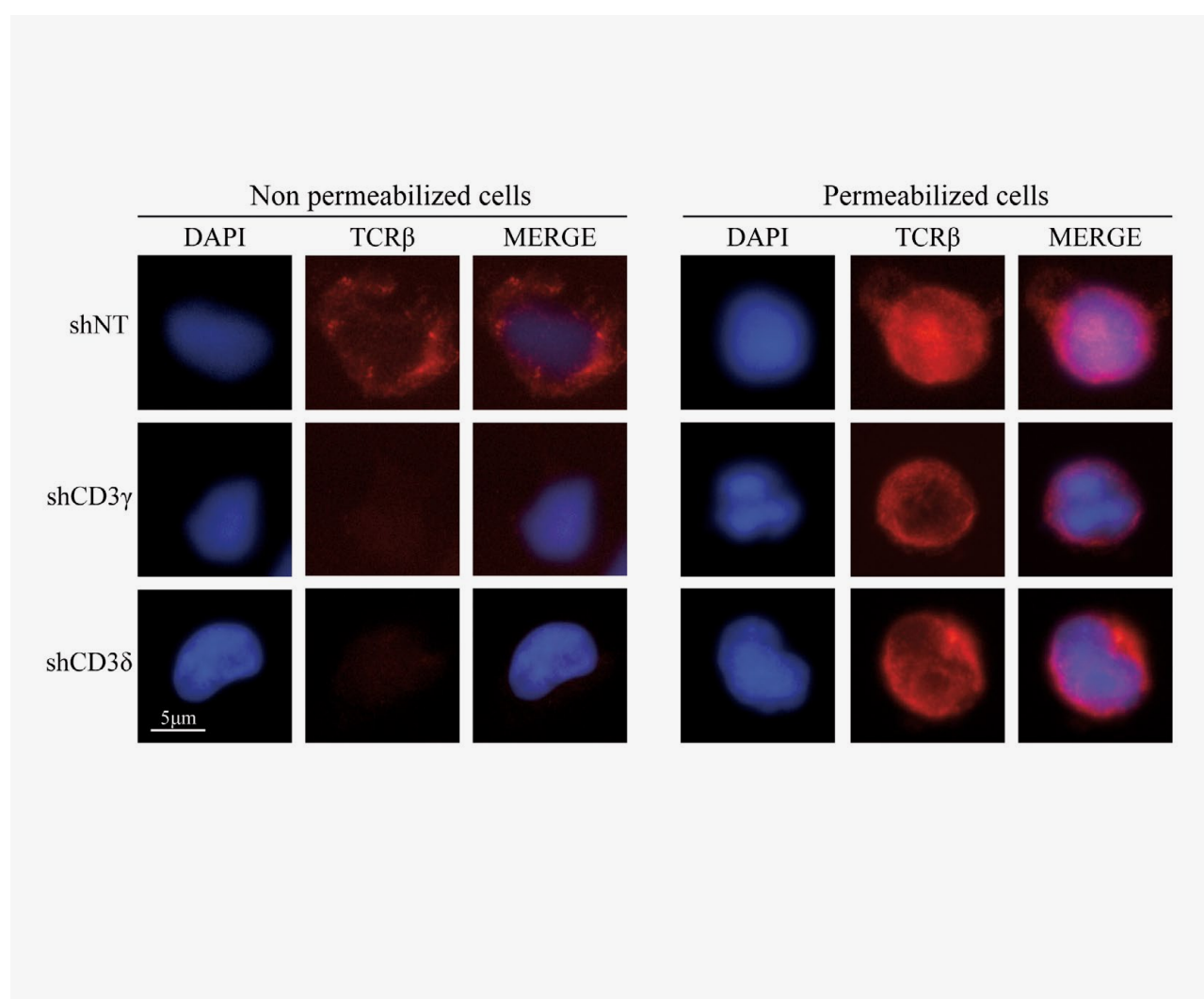


Figure R1.5: EC and IC TCR β expression by fluorescence microscopy. Jurkat cells were treated with TritonX-100 (permeabilized) or left untreated (non permeabilized), and incubated with anti-TCR β antibody (JOVI-1) and anti-mouse AF594 secondary antibody. Nuclei were stained with DAPI.

NA disponibles. El análisis por citometría de flujo extracelular mostró que el efecto de las diferentes secuencias shRNA sobre la expresión del TCR en membrana correlacionaba con el grado de silenciamiento medido por WB (fig. R1.1 y R1.6A y B). Se calculó la correlación entre estos dos parámetros

(silenciamiento por WB y expresión del TCR en superficie) utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, el análisis mostró una fuerte correlación lineal positiva, es decir, que a mayor reducción de la cadena, mayor pérdida de expresión del TCR en membrana (fig. R1.6C).

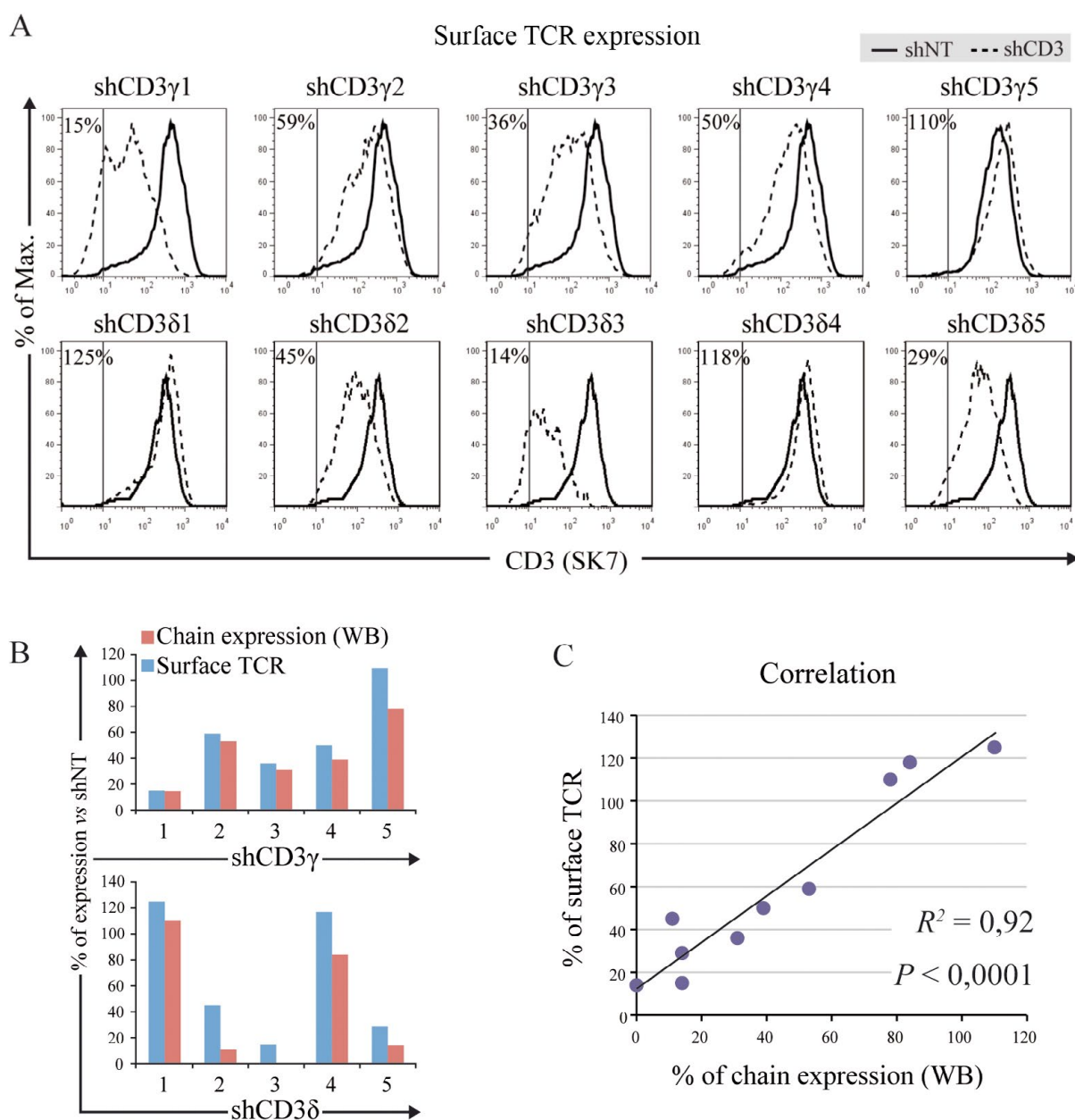


Figure R1.6: Surface TCR levels correlate with KD efficiency. **A:** Jurkat TCR surface expression after treatment with the indicated shRNA sequences (dashed lines) compared to shNT (solid lines). Numbers indicate % of expression vs shNT. **B:** Bar representation of % expression vs control (shNT) for each shRNA sequence. Blue bars indicate surface TCR expression measured by flow cytometry and red bars chain expression measured by WB. **C:** Correlation between chain expression and surface TCR was measured by the Pearson's coefficient of correlation (r) ($N=10$; $r=0,96$; 99% confidence interval= $0,7522$ to $0,9943$; $P<0,0001$; $R^2=0,92$).

Por tanto, estos resultados corroboran que el efecto observado sobre la expresión del TCR con las secuencias elegidas (shCD3 γ -1 y shCD3 δ -3) es producto del silenciamiento de las cadenas CD3 γ o CD3 δ y no de efectos inespecíficos.

También cabe destacar que el impacto del silenciamiento sobre la expresión del TCR en membrana es, en todos los casos, menor que el impacto observado sobre los niveles intracelulares de cada cadena; por ejemplo, shCD3 γ -4 expresa un 50% de TCR en su membrana y sin embargo un 39% de CD3 γ intracelular. Estas diferencias seguramente sean debidas a que, como ya se ha mencionado en la introducción, tanto la cadena CD3 γ como CD3 δ son sintetizadas en exceso.

1.3. INCORPORACIÓN DE LA CADENA ζ AL TCR

Tras determinar que no era posible la expresión en membrana del TCR en las líneas Jurkat KD para CD3 γ o CD3 δ , quisimos averiguar en qué paso del ensamblaje del TCR se producía el bloqueo. Para ello fuimos analizando diferentes eventos del ensamblaje. En primer lugar, analizamos el paso previo a la expresión en membrana, es decir, la incorpo-

ración del homodímero $\zeta\zeta$ al TCR hexamérico en el aparato de Golgi.

Para ello se realizaron co-IP de ζ y otras cadenas del TCR. Se lisaron células Jurkat tratadas con los distintos shRNA en Brij96V, ya que se sabe que este detergente preserva la asociación de los componentes del TCR (95) y se inmunoprecipitó siguiendo dos estrategias: co-IP de TCR β y ζ y co-IP de CD3 ϵ y ζ . En primer lugar se inmunoprecipitó el TCR utilizando anticuerpos anti-TCR β y posteriormente se revelaron los precipitados con anti- ζ ; los resultados mostraron que ζ co-precipita con TCR β en las células control pero no en las células shCD3 γ o shCD3 δ (fig. R1.7A). En segundo lugar, se realizó la IP con anti- ζ y se reveló con anti-CD3 ϵ ; los resultados revelaron que CD3 ϵ co-precipita con ζ en las células control pero no en las células KD (fig. R1.7B).

Estos datos indican que en las células Jurkat shCD3 γ y shCD3 δ el homodímero $\zeta\zeta$ no se asocia con el resto de cadenas que forman el TCR ya que ζ no co-precipita con TCR β ni con CD3 ϵ , por tanto el bloqueo en la ruta de ensamblaje del TCR puede estar en este punto o bien en un paso anterior.

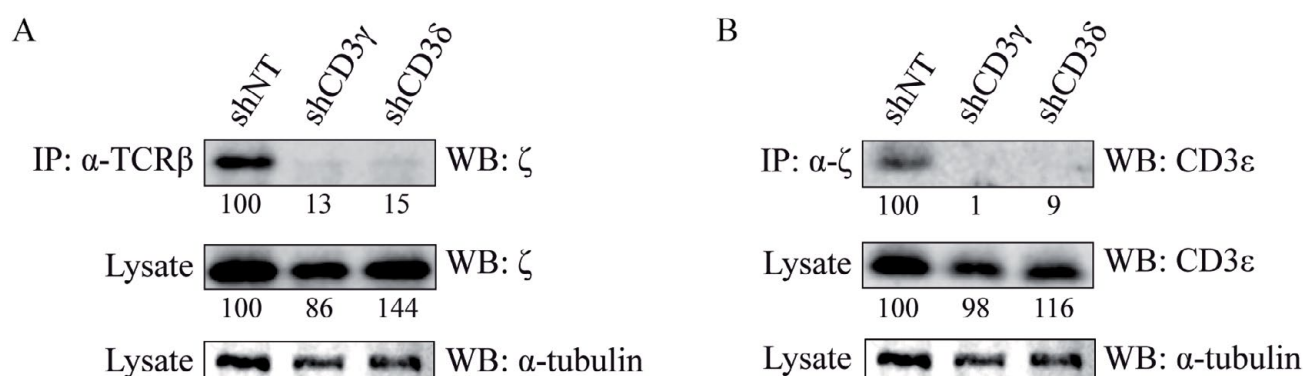


Figure R1.7: Co-IP of ζ and other TCR chains in Jurkat KD cell lines. **A:** cells were lysed in Brij96V buffer, 3 mg of total protein were immunoprecipitated with anti-TCR β mAb (Jovi-1), the immunoprecipitates and whole lysates were resolved in 15% SDS-PAGE gels and immunoblotted with antibodies against ζ (448) or α -tubulin (Sigma). **B:** Immunoprecipitation was done with anti- ζ and immunoblotted with mAb against CD3 ϵ (Abcam) or α -tubulin (Sigma). Band analysis and numbers as in Fig. R1.1.

1.4. TRANSPORTE DEL TCR DESDE EL RE AL APARATO DE GOLGI

Posteriormente se analizó si las cadenas que forman el TCR hexamérico ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) se exportaban desde el RE al aparato de Golgi, para lo que se siguieron dos estrategias diferentes: co-localización de TCR β y ζ en compartimentos subcelulares y estudio del estado de glicosilación de CD3 γ y CD3 δ .

En primer lugar se analizó por microscopía de fluorescencia la co-localización de TCR β y ζ en el interior de la célula. Se ha descrito que la cadena ζ se transporta al aparato de Golgi independientemente del resto de cadenas del TCR y, por tanto, se localiza predominantemente en este compartimento subcelular (58). De este modo, si TCR β se exporta desde el RE al aparato de Golgi se observará co-localización de ambas proteínas. El análisis por microscopía de fluorescencia de la distribución de estas dos proteínas mostró que en las células control (paneles superiores) TCR β y ζ coexistían en el mismo compartimento subcelular, ya que se observaba

co-localización. Sin embargo, en las células shCD3 γ y shCD3 δ , estas dos proteínas no co-localizaban y por consiguiente se encontraban en compartimentos subcelulares diferentes (fig. R1.8). Estos datos parecen indicar que la cadena TCR β y seguramente el resto de cadenas que forman el TCR hexamérico, quedan retenidas en el RE y no alcanzan el aparato de Golgi.

En segundo lugar se estudió el estado de glicosilación de la cadena CD3 γ en la línea shCD3 δ y de la cadena CD3 δ en la línea shCD3 γ . Como se explicó en el apartado 3.5 de la introducción, CD3 γ y CD3 δ son glicoproteínas que unen azúcares en residuos de Asn (N-glicosilación), estos azúcares se van modificando según el compartimento subcelular donde se encuentra la glicoproteína, de modo que el estudio del estado de glicosilación de los péptidos revela su localización subcelular. Cuando las glicoproteínas se exportan desde el RE hacia el aparato de Golgi, el oligosacárido precursor común se hace resistente a la digestión por la enzima endoglicosidasa-H (EndoH), de esta manera

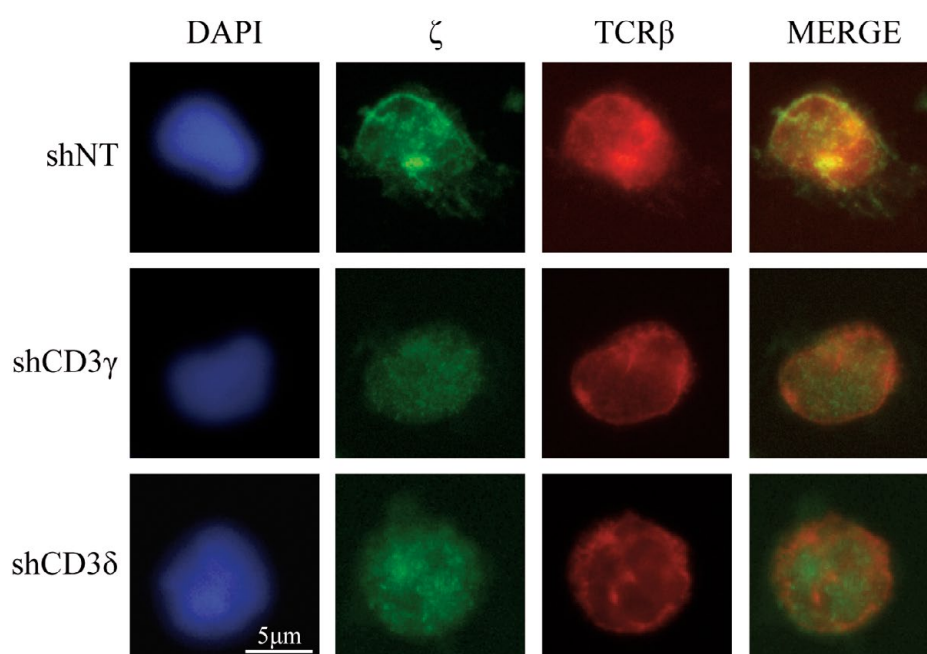


Figure R1.8: TCR β and ζ localization by fluorescence microscopy. Jurkat cells were fixed with PFA, permeabilized with TritonX-100, and incubated with anti-TCR β (JOVI-1) and anti- ζ (488) antibodies followed by anti-mouse AF594 and anti-rabbit AF350 secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Colocalization is visualized as yellow patches.

podemos servirnos de la susceptibilidad a EndoH para determinar si la glicoproteína ha abandonado el RE.

Para el análisis de la susceptibilidad a la enzima EndoH, se inmunoprecipitaron las cadenas CD3 γ y CD3 δ utilizando anticuerpos específicos para estas cadenas. Los inmunoprecipitados se trataron o no con la enzima EndoH durante 3h a 37°C y se analizó por SDS-PAGE y posterior WB el estado de glicosilación de estas cadenas. Los azúcares confieren más peso molecular a las glicoproteínas, por lo que la digestión con esta enzima provoca una disminución de tamaño fácilmente observable. Para determinar el porcentaje de glicoproteínas residentes en el RE o que han abandonado el RE, se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a las glicoproteínas que habían perdido parte de sus azúcares (EndoH sensibles) y las que no se veían alteradas por el tratamiento (EndoH resistentes).

El análisis de las formas resistentes o sensibles de CD3 γ mostró que en las células control (shNT)

aproximadamente el 60% de la cadena CD3 γ se encontraba en el RE (EndoH sensible), mientras que el 40% se había exportado fuera del RE (EndoH resistente). Sin embargo, en la línea shCD3 δ se observaba que el 97% de la cadena CD3 γ era sensible a EndoH y por tanto se localizaba en el RE y apenas un 3% era capaz de abandonar el RE (fig. R1.9A).

El análisis de la glicosilación de CD3 δ reveló una situación similar, en las células control aproximadamente el 50% de la cadena CD3 δ residía en el RE (EndoH sensible), mientras que el otro 50% se había exportado fuera del RE (EndoH resistente). Sin embargo, en la línea shCD3 γ el porcentaje de CD3 δ localizado en el RE aumentaba hasta el 90% y tan solo un 10% era capaz de exportarse (fig. R1.9B).

Estos resultados, junto con los obtenidos por microscopía de fluorescencia, indican que en células Jurkat shCD3 γ y shCD3 δ , las cadenas que forman el TCR quedan retenidas en el RE y no se exportan hacia el aparato de Golgi.

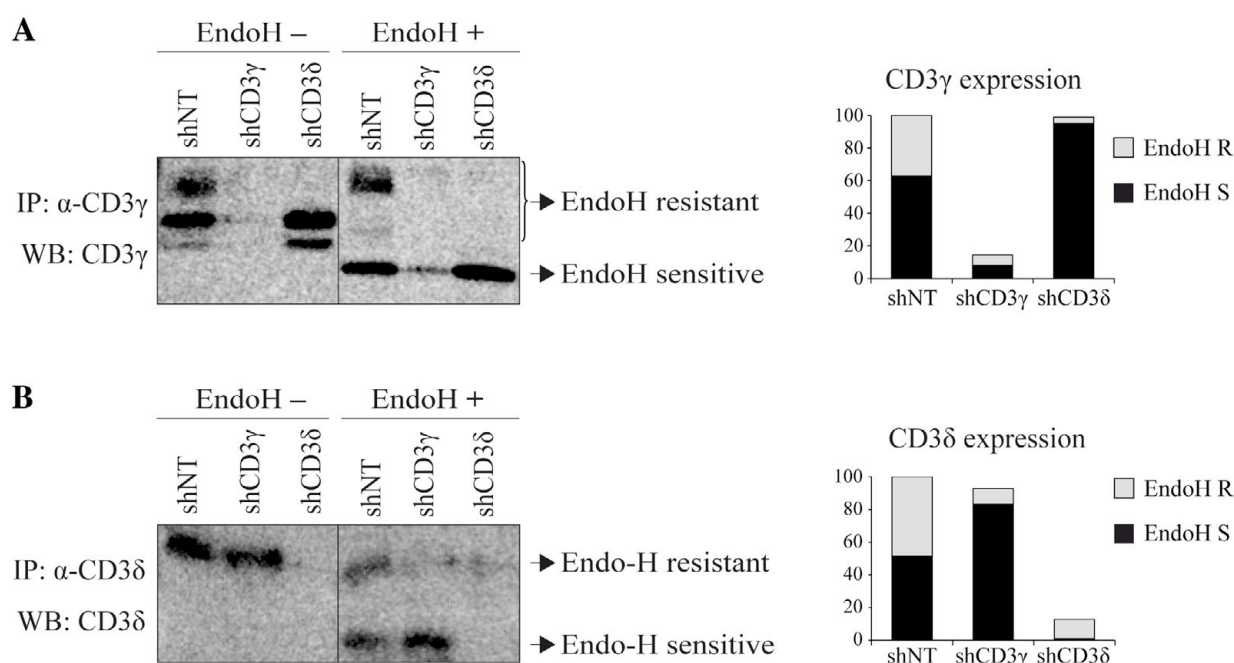


Figure R1.9: EndoH susceptibility of CD3 γ and CD3 δ . **A:** Cells were lysed in Brij96V buffer and immunoprecipitated with anti-CD3 γ (HMT3.2). Half of the immunoprecipitated proteins were treated with EndoH. Samples were analyzed in 15% SDS-PAGE gels and immunoblotted with anti-CD3 γ antibody (Abcam). Graph represents the quantification of EndoH resistant (R) and EndoH sensitive (S) species. **B:** Cells were immunoprecipitated with anti-CD3 δ (APA1/2) antibody and immunoblotted with anti-CD3 δ (Abcam). Sample preparation, treatment with EndoH and analysis as in A.

1.5. ANÁLISIS ESTEQUIOMÉTRICO DE LOS INTERMEDIARIOS ENSAMBLADOS EN EL RE

La siguiente pregunta que quisimos responder fue si era posible ensamblar TCR hexaméricos en el RE en ausencia de CD3 γ o CD3 δ o si bien sólo se podían formar TCR parciales. Para responder a esta pregunta se llevaron a cabo experimentos de co-IP de TCR β con CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ , se precipitó el TCR con anticuerpos específicos para TCR β y se analizó por SDS-PAGE y posterior WB la co-precipitación de las cadenas CD3 (fig. R1.10). La cuantificación de 3 experimentos independientes mostró que en la línea shCD3 γ la cantidad de CD3 ϵ y CD3 δ que co-precipitaba con la cadena TCR β era aproximadamente la mitad que en las células control. Estos resultados parecen indicar que existe un bloqueo en la formación del TCR hexamérico, de modo que en la línea shCD3 γ se formarían hemicomplejos con estequio-

metría $\alpha\beta\delta\epsilon$ y posiblemente también con estequiometría $\alpha\delta\epsilon$ que no podríamos valorar usando esta estrategia de co-IP. Sin embargo, la línea shCD3 δ mostró un comportamiento diferente, la cantidad de CD3 ϵ que co-precipitaba junto con TCR β era similar a la línea control, mientras que la cantidad de CD3 γ era aproximadamente el doble; estos resultados sugieren que en la línea shCD3 δ se estarían formando TCR hexaméricos con estequiometría $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$, es decir, capaces de incorporar dos dímeros $\gamma\epsilon$.

Estos resultados parecen indicar que el bloqueo en la expresión del TCR en superficie en la línea shCD3 γ se debe a que en ausencia de CD3 γ no es posible el ensamblaje del TCR hexamérico. Sin embargo, la línea shCD3 δ mostró un comportamiento diferente; en este caso sí se podrían ensamblar TCR hexaméricos con estequiometría $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$, pero estos

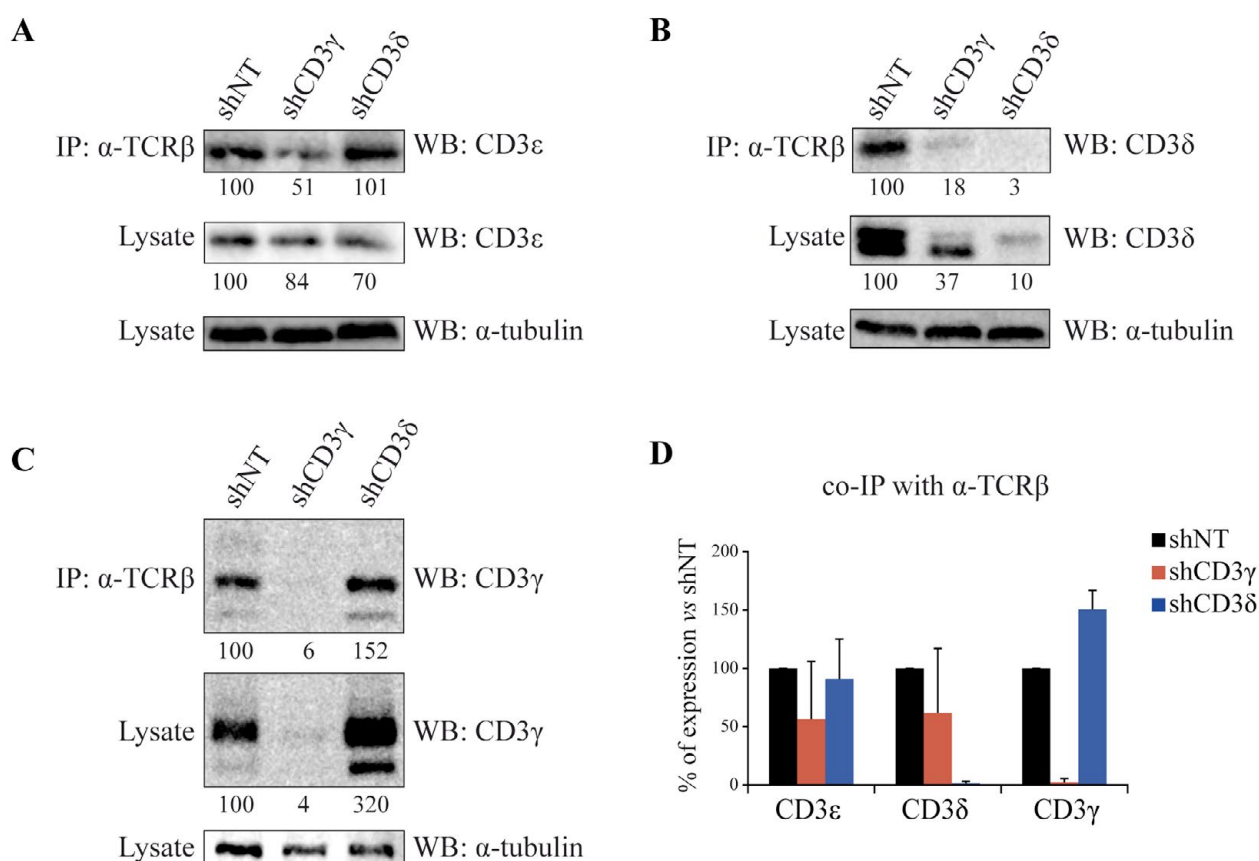


Figure R1.10: Co-IP of TCR β and CD3 chains in Jurkat KD cell lines. Cells were lysed in Brij96V buffer, 3 mg of total protein were immunoprecipitated with the anti-TCR β mAb Jovi-1, the immuno-precipitates and whole lysates were resolved in 15% SDS-PAGE gels, transferred into PVDF membranes and immunoblotted with antibodies against α -tubulin and CD3 ϵ in **A**, CD3 δ in **B** or CD3 γ in **C**. Band analysis and numbers as in Fig. R1.1. **D**: quantification of 3 different experiments, data are mean values + SD.

TCR quedarían retenidos en el RE impidiéndose su transporte hacia el aparato de Golgi. Los experimentos de co-IP de la cadena TCR β con las cadenas CD3 también parecen indicar que TCR α es capaz de asociarse, no sólo con el dímero $\epsilon\delta$, sino también con el dímero $\gamma\epsilon$, y que sin embargo la cadena TCR β sería menos promiscua ya que sólo tendría la capacidad de asociarse con el dímero $\gamma\epsilon$.

1.6. KD EN OTRAS LÍNEAS T Y EN LINFOCITOS T PRIMARIOS

Debido a la discrepancia observada entre las células de pacientes deficientes de CD3 γ , que sí son capaces de expresar el TCR y las líneas Jurkat shCD3 γ que no lo son, nos propusimos averiguar si esta incapacidad de expresar el TCR era específica de la línea Jurkat o no, para ello se analizó el efecto del silenciamiento en otras líneas celulares y en PBL de individuos sanos.

En primer lugar nos preguntamos si la incapacidad de la línea Jurkat de expresar un TCR sin CD3 γ y también sin CD3 δ se debía al TCR que expresa esta línea celular. Podría ser que ciertos TCR permitiesen la expresión de dos dímeros $\delta\epsilon$ o $\gamma\epsilon$ y otros TCR no. Para probar esta hipótesis se infectaron células Jurkat CH7C17 (V α 1.4, V β 3.1) que expresan cadenas TCR α y TCR β diferentes a la línea Jurkat E6-1 original (V α 1, V β 8). La eficiencia de transducción de la línea Jurkat CH7C17 no fue tan alta como la obtenida con la línea Jurkat E6-1, por lo que no se consiguió un silenciamiento tan intenso. Aun así, se comparó la expresión de la cadena silenciada por citometría de flujo intracelular con los niveles de expresión del TCR en superficie, medido como la expresión extracelular de CD3 ϵ . La línea shCD3 γ muestra un 43% de expresión de CD3 γ con respecto al control y un 43% de expresión del TCR en la superficie celular (fig. R1.11A paneles superiores). Del mismo modo, la línea shCD3 δ expresa un 45% de CD3 δ intracelular y un 35% de TCR en superficie. Estos resultados indican que existe una correlación entre los niveles de expresión de la cadena y la expresión del TCR en membrana, por tanto podemos concluir que en la línea celular Jurkat CH7C17 tampoco es posible la expresión del TCR en ausencia de CD3 γ o CD3 δ .

La siguiente pregunta que quisimos contestar fue si la falta de expresión del TCR en las líneas KD era inherente al sistema, es decir a la línea Jurkat. Para descartar esta hipótesis se generaron líneas KD utilizando una línea de linfocitos T diferente, la línea HPB-ALL. En este caso tampoco se obtuvieron eficiencias de transducción altas, pero comparamos también la reducción a nivel intracelular de la cadena silenciada con los niveles de expresión del TCR en la membrana (fig. R1.11A paneles centrales). Los resultados obtenidos para esta línea, al igual que para Jurkat E6-1 y Jurkat CH7C17, indican que la reducción de los niveles intracelulares de CD3 γ o CD3 δ ocasiona una disminución similar en los niveles de expresión del TCR en la superficie celular.

Por último, quisimos comprobar si los resultados obtenidos en líneas celulares también se reproducían en linfocitos T frescos aislados de sangre periférica de donantes sanos (fig. R1.11A paneles inferiores). Los datos obtenidos en PBL apuntan en la misma dirección: no es posible expresar el TCR en ausencia de CD3 γ o CD3 δ en linfocitos T maduros.

Los datos obtenidos con estos 3 tipos celulares se representaron sobre el modelo previamente generado con las diferentes secuencias shRNA y las células Jurkat E6-1 (fig. R1.11B). Hay que tener en cuenta que para generar el modelo (puntos negros en la gráfica), el nivel de silenciamiento (KD) se valoró por WB mientras que en los tipos celulares que analizamos en este apartado (puntos de colores) el KD se valoró por citometría de flujo intracelular. Aun así, se observa que los nuevos datos se ajustan a nuestro modelo, y por tanto nos permite afirmar que existe una relación directa entre los niveles de expresión de CD3 γ o CD3 δ y la expresión del TCR en la superficie celular. Estos resultados demuestran que la deficiencia inducida de CD3 γ o CD3 δ imposibilita la expresión del TCR en linfocitos T maduros.

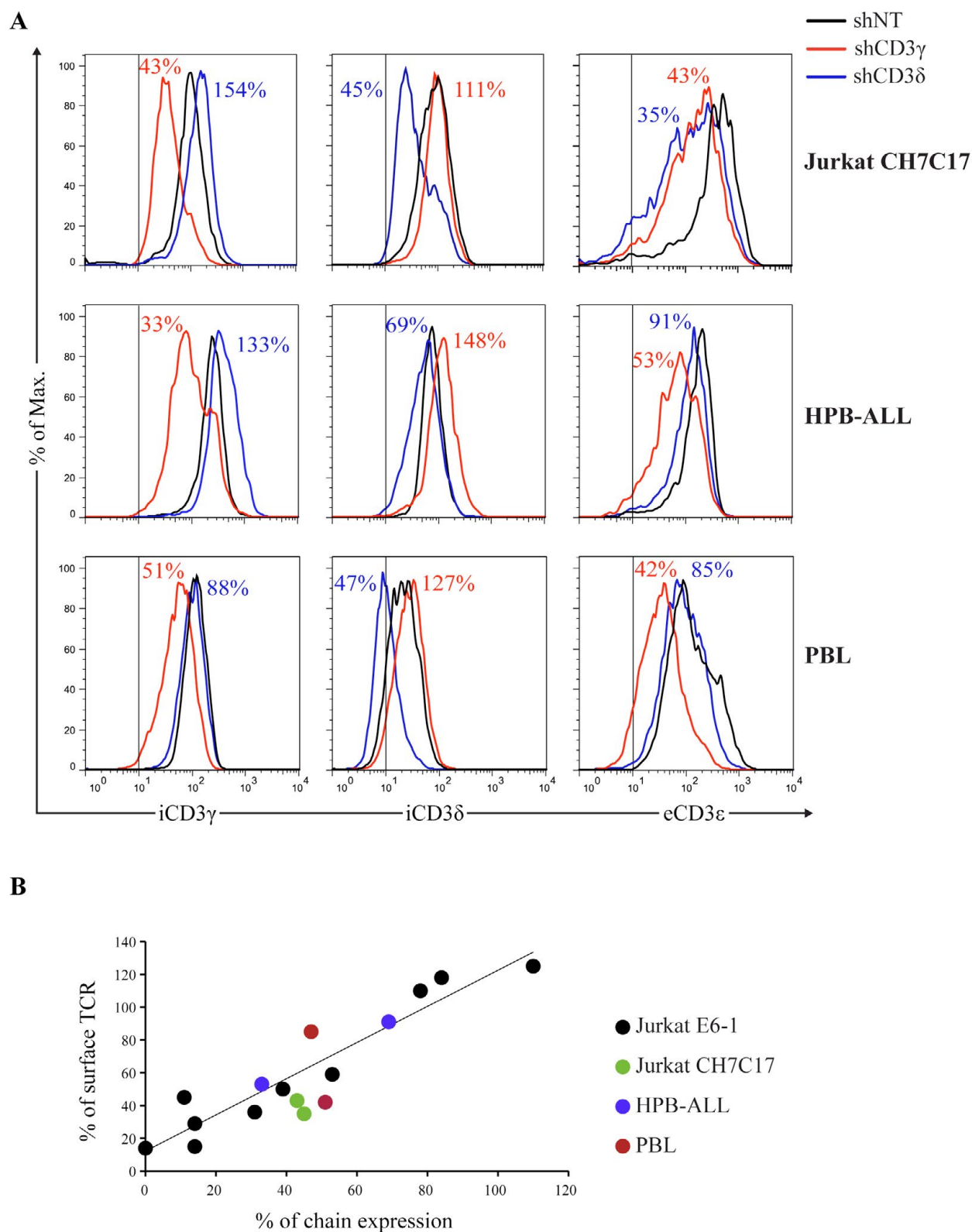


Figure R1.11: CD3 KD and surface TCR expression correlate in T cells other than Jurkat E6-1. A: Comparative intracellular CD3 γ (iCD3 γ) or CD3 δ (iCD3 δ) expression and surface CD3 ϵ expression in the indicated T cells transduced with shCD3 γ , shCD3 δ or shNT. For intracellular staining cells were fixed with PFA, permeabilized with saponin and stained with anti-CD3 γ or anti-CD3 δ (both from Abcam) followed by a secondary fluorescent antibody (anti-rabbit PE). Extracellular CD3 ϵ was measured using anti-CD3 ϵ Hit3A-APC. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Vertical lines indicate the upper limit staining of the isotype control. Numbers indicate % expression vs control (shNT). **B:** Graphical representation of data in A (colored dots) in comparison with the WB data (black dots) and linear regression observed in Jurkat E6-1 (fig. R1.6).

2. Deficiencia parcial de CD3δ

En nuestro laboratorio se describieron en 2011 dos pacientes de origen ecuatoriano con una mutación (hasta el momento no descrita) en el gen *CD3D*, que produce un *splicing* aberrante en el 90% de los casos y permite un 10% de *splicing* normal. Las características clínicas y la mutación se explican en la introducción de esta tesis. En este segundo bloque de resultados, nos centraremos en el efecto de la mutación sobre la selección de las células T, la expresión del TCR y la función de las células T en respuesta a estímulos TCR-dependientes.

2.1. ESTUDIO DEL DESARROLLO Tαβ Y Tγδ

Para el estudio de la función tímica, se analizaron los números y porcentajes de linfocitos T y la policlonalidad de éstos.

En primer lugar, se analizaron los números de linfocitos Tαβ y Tγδ en los dos pacientes. Para ello nos servi-

mos de los recuentos de linfocitos en sangre periférica facilitados por los hospitales y se cruzaron con los porcentajes de células TCRαβ⁺ y TCRγδ⁺ determinados por citometría de flujo en nuestro laboratorio. Los datos obtenidos se compararon con los rangos de normalidad (p95, p50 y p5) en individuos sanos de la misma edad. Los resultados muestran una reducción, de aproximadamente 10 veces, en el número de linfocitos Tαβ en los dos pacientes en comparación con los controles. Sin embargo, los números de linfocitos Tγδ se encontraban dentro del rango de normalidad (fig. R2.1A). El análisis de los números relativos de células Tαβ y Tγδ mostró que debido a la linfopenia Tαβ, casi la mitad de los linfocitos T de sangre periférica de ambos pacientes pertenecían al linaje γδ, mientras que en individuos sanos estas células no superan el 10% (fig. R2.1B).

Posteriormente, se analizó la función tímica, se examinó la clonalidad de las células αβ y γδ en

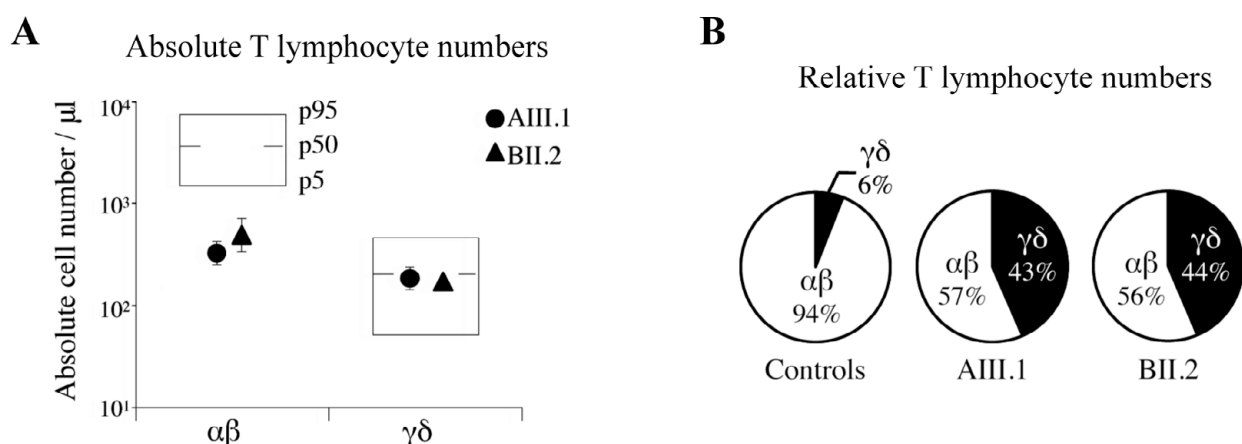


Figure R2.1: T lymphocyte numbers in two patients with partial CD3δ deficiency (AIII.1 and BII.2). A: Absolute $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell numbers (mean \pm SD) in comparison with the normal age-matched distribution in percentiles. B: Relative $\alpha\beta$ (white) and $\gamma\delta$ (black) T cell numbers.

colaboración con Félix García-Sánchez (Centro de transfusiones de la CAM) y Paul Fisch (Albert-Ludwigs-University, Friburgo, Alemania) respectivamente. Se analizaron en células T de sangre periférica los reordenamientos $V\beta J\beta$ del gen *TCRB* y el espectraltipo de las regiones CDR3 del gen *TCRD*.

El análisis de los reordenamientos $V\beta J\beta$ del gen *TCRB* mostró una reducción de los reordenamientos, especialmente para el paciente BII.2 (fig. R2.2A). Estos datos indican que las células $\alpha\beta$ de los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ son menos policlonales que las de un individuo normal, es decir, que basándonos en el repertorio de la región $V\beta$ de la cadena TCR β , podemos afirmar que las células $\alpha\beta$ de los pacientes son oligoclonales. Además, estas pocas células $\alpha\beta$ eran en su mayoría células efectoras de memoria mientras que los porcentajes de células $\alpha\beta$ vírgenes estaban muy reducidos (figura suplemental 8 JCI 2011, anexo).

Sin embargo, las células $\gamma\delta$ presentaban una policlonalidad de la región CDR3 de los segmentos génicos V δ 1, V δ 2 y V δ 3 normal en los dos pacientes con

deficiencia parcial de CD3 δ . Es decir, que la prevalencia de linfocitos T $\gamma\delta$ no se debía a expansiones clonales causadas por infecciones como ocurre en algunos casos de SCID (121), si no que estos pacientes presentaban números normales de linfocitos T $\gamma\delta$ con un repertorio de la cadena *TCRD* policlonal y normal.

En conclusión, estos datos indican que existe un bloqueo en el desarrollo del linaje T $\alpha\beta$ en la deficiencia parcial de CD3 δ y que sin embargo, el linaje T $\gamma\delta$ no se ve afectado.

2.2. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA PARCIAL DE CD3 δ SOBRE LA EXPRESIÓN DEL TCR

A continuación estudiamos la expresión del TCR en membrana en células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ utilizando diferentes anticuerpos anti-CD3. Los resultados mostraron un defecto de expresión del TCR en ambos linajes. Las células $\alpha\beta$ de los pacientes expresaban 2-3 veces menos TCR en la membrana en comparación con las células control. Sin embargo, las células $\gamma\delta$ mostraban un defecto mayor, ya que expresaban aproximadamente 10 veces menos TCR que las células control (fig. R2.3A).

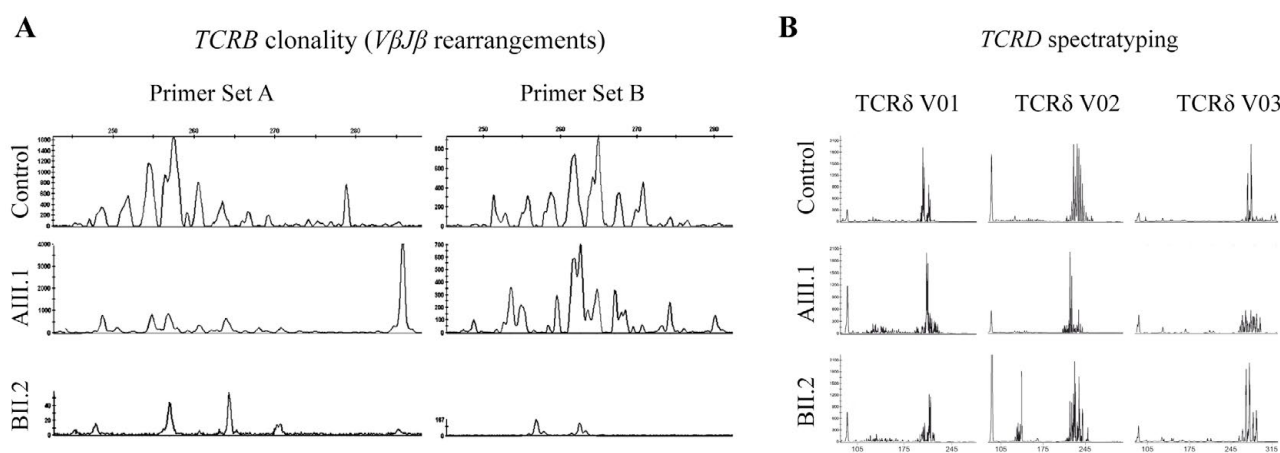


Figure R2.2: TCR β and TCR δ clonality. **A:** Genomic *TCR V $\beta J\beta$* rearrangements were amplified in the patients using two different primer sets (A and B) and compared with a normal donor in the 240-280 bp range. The two primer sets are specific for conserved V and J flanking regions, and therefore amplify genomic *TCR V $\beta J\beta$* rearrangements as fragments of the indicated size range. Normal T lymphocytes are polyclonal and thus show a Gaussian fragment size distribution. Patients with poor TCR β diversity show fewer peaks without a Gaussian distribution. **B:** $\gamma\delta$ T cell repertoire analysis by V δ CDR3 length profiling. Abscissae are base pairs as indicated, ordinates are peak heights.

Estos resultados demuestran que la deficiencia parcial de CD3 δ afecta a la expresión en membrana del TCR y que además afecta de distinto modo a la expresión del TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, siendo el defecto 5 veces mayor en las células $\gamma\delta$ que en las células $\alpha\beta$.

En siguiente lugar quisimos comprobar si estas diferencias en los niveles de expresión del TCR, entre células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, se debían a distintos niveles de CD3 δ intracelular en los dos linajes. Las diferencias de expresión observadas en la membrana podrían deberse a que el efecto del *splicing* aberrante fuese distinto en estos dos linajes, siendo más intenso en las células $\gamma\delta$ y explicando el mayor defecto de expresión.

Para comprobar esta hipótesis se analizó por citometría de flujo intracelular la cantidad de CD3 δ en linfocitos T cultivados TCR $\alpha\beta^+$ y TCR $\gamma\delta^+$. Los resultados mostraron una reducción similar (alrededor de 2 veces) en las células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ de ambos pacientes (fig. R2.3B). Cabe destacar que las células $\gamma\delta$ mostraban una reducción ligeramente mayor que las células $\alpha\beta$, pero esta mínima diferencia no puede explicar las diferencias observadas en la expresión en superficie.

Por tanto, estos datos indican que existe una discrepancia entre los niveles de CD3 δ intracelular y los niveles de expresión del TCR en la membrana en las células $\gamma\delta$ con respecto a las $\alpha\beta$. La cantidad de CD3 δ intracelular en ambos linajes es aproximadamente la mitad que en células control, pero sin embargo, la reducción de expresión en membrana es 5 veces mayor en las células $\gamma\delta$. Es decir, la deficiencia parcial de CD3 δ pese a ser cuantitativamente similar en las dos poblaciones de células, produce un efecto diferente en cada una de ellas.

Para averiguar el origen de esta discrepancia, se silenció la expresión de CD3 δ en células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ de individuos sanos y se analizó el efecto sobre la expresión del TCR en membrana. Para el silenciamiento o KD se empleó la secuencia shRNA específica de CD3 δ empleada en el primer bloque de resultados. Se aislaron PBL de individuos sanos y se infectaron con lentivirus que portaban este shRNA, tras varios días de cultivo en presencia de puromicina, se analizó por citometría de flujo intracelular la eficiencia del KD. Se cuantificaron los niveles de CD3 γ (como molécula control) y CD3 δ (para evaluar el silenciamiento) a nivel intracelular en células GFP $^+$.

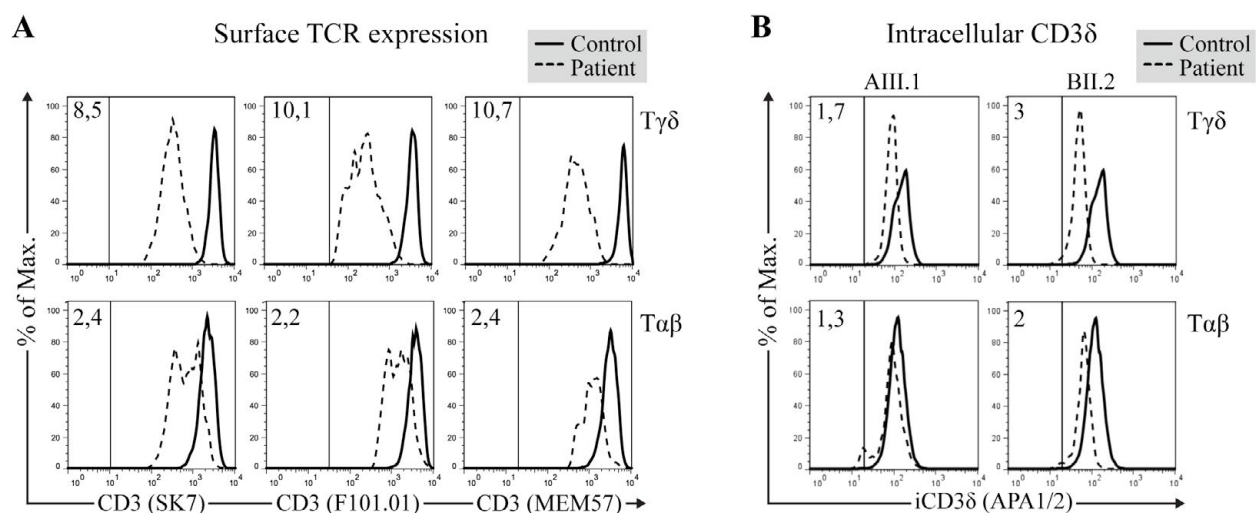


Figure R2.3: Extracellular TCR expression and intracellular CD3 δ expression. **A:** Comparative surface TCR expression in primary $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells. Cells were stained with direct (SK7) or indirect antibodies (F101.01 and MEM57) followed by a fluorescent secondary antibody (anti-mouse PE) and analyzed by flow cytometry. $\alpha\beta$ T cells were gated as TCR $\alpha\beta^+$ (IP26) and $\gamma\delta$ T cells as TCR $\gamma\delta^+$ (IMMU510). Similar results were obtained for AIII.1 (not shown), and with TCR-specific mAb. **B:** Intracellular CD3 δ levels in cultured T cells. Cells were fixed with PFA and permeabilized with saponin, IC CD3 δ (iCD3 δ) was stained using APA1/2 mAb after gating for TCR $\alpha\beta^+$ (IP26) or TCR $\gamma\delta^+$ (IMMU510) cells, respectively. The vertical lines indicate the upper limit of the isotype control staining. The numbers in each histogram indicate control/patient geoMFI ratios.

Se observa que el silenciamiento es específico: la cantidad de CD3 γ se mantiene constante, mientras que la cantidad de CD3 δ se reduce a la mitad con respecto al control (fig. R2.4A). De este modo obtuvimos un modelo muy similar a las células con deficiencia parcial de CD3 δ , ya que tanto las células de los pacientes como las líneas KD expresaban un 50% menos de CD3 δ que sus controles.

Tras validar las líneas KD para CD3 δ , pasamos a evaluar en células TCR $\alpha\beta^+$ y células TCR $\gamma\delta^+$ la expresión en membrana del TCR. Los resultados mostraron que la disminución de CD3 δ afectaba por igual, con una caída del 25-30%, a la expresión del TCR en los dos linajes (fig. R2.4B). Por tanto, estos resultados descartan que la discrepancia observada en las células $\gamma\delta$ de los pacientes entre niveles intracelulares y expresión en membrana se debiese a un efecto bioquímico diferencial, por ejemplo en la afinidad de CD3 δ por las cadenas variables. Es decir, la disminución de CD3 δ en células maduras afecta por igual al ensamblaje del TCR $\alpha\beta$ y del $\gamma\delta$, por lo que podemos concluir que la reducción en los niveles de CD3 δ intracelular no puede ser la causa *per se* de las diferencias observadas en la expresión del TCR $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ en los pacientes.

Estos resultados sugieren que los diferentes niveles de expresión del TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en los pacientes podrían ser el resultado de la diferente dependencia en los niveles de TCR de las células $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ para la selección tímica. De esta manera se seleccionarían sólo células $\alpha\beta$ con altos niveles de expresión del TCR, mientras que la selección sería más permisiva para las células $\gamma\delta$, permitiendo la selección de células $\gamma\delta$ con bajos niveles de expresión del TCR, como se observa en los pacientes.

2.3. SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DEL TCR

Posteriormente, quisimos analizar la capacidad de las células con deficiencia parcial de CD3 δ de transmitir señales a través del TCR. En primer lugar se analizó la capacidad de inducir la expresión de las moléculas de activación CD69 y CD25 en células $\alpha\beta$ frescas del paciente BII.2. Para ello se aislaron células mononucleares de sangre periférica mediante gradiente de densidad y se estimularon con anticuerpos anti-CD3. Posteriormente se analizó por citometría de flujo extracelular la inducción de CD69 y CD25 tras 24h o 36h de estimulación respectivamente. El análisis del incremento de geoMFI en los linfocitos T $\alpha\beta$ (definidos como CD4 $^+$ + CD8 bright) muestra que las células del paciente inducen un 90%

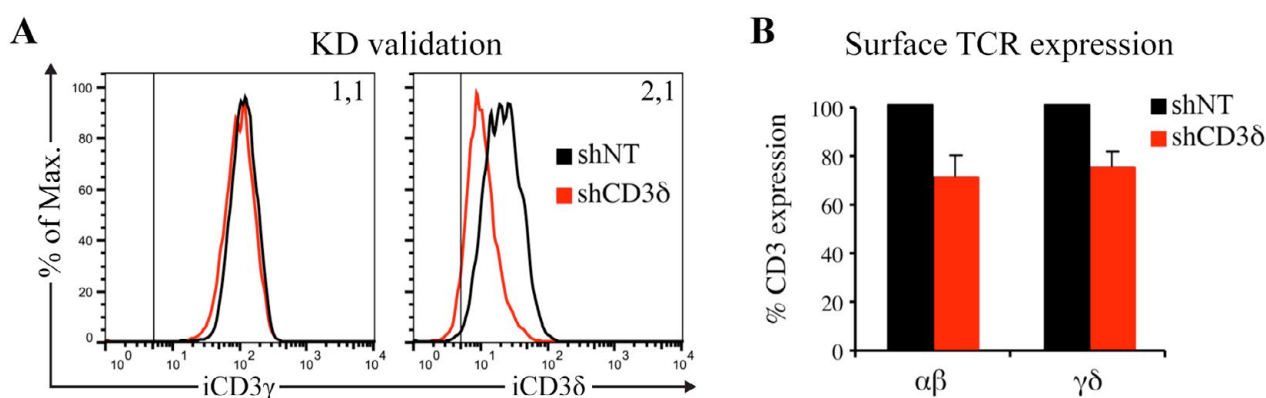


Figure R2.4: CD3 δ KD in normal primary T cells. **A:** KD specificity was ascertained in permeabilized samples by flow cytometry using CD3 δ - or, as a negative control, CD3 γ -specific mAb to probe for intracellular CD3 expression (iCD3 δ (EPR4426) and iCD3 γ (EPR4517) from Abcam). The numbers in each histogram indicate shNT/shCD3 δ geoMFI ratios. **B:** PBMC from healthy donors were infected with lentiviruses carrying shRNA for CD3 or shNT. After selection with puromycin, GFP $^+$ cells were analyzed for surface TCR expression using anti-CD3 mAb (SK7) and normalized to shNT control (n=2, mean \pm SD). $\alpha\beta$ T cells were gated as TCR $\alpha\beta^+$ (IP26) and $\gamma\delta$ T cells as TCR $\gamma\delta^+$ (IMMU510).

menos la expresión de CD69 y CD25 en comparación con las células control (fig. R2.5A).

También se analizó en células cultivadas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ del paciente BII.2 la inducción de CD69 en respuesta a concentraciones crecientes de células *feeder* alogénicas o anticuerpo anti-CD3. Los resultados, medidos en este caso como porcentaje de células CD69⁺, muestran que la inducción de CD69 en los linfocitos T $\alpha\beta$ de los pacientes es menor en comparación con las células control, haciéndose más notables estas diferencias a mayor concentración de estímulo (fig. R2.5B, paneles superiores). Sin embargo, la inducción de CD69 en las células $\gamma\delta$ del paciente es comparable a la de las células control, pese a tener un mayor defecto de expresión del TCR que las $\alpha\beta$ (fig. R2.5B, paneles inferiores). En conclusión, los linfocitos T $\alpha\beta$ de los pacientes muestran un defecto de activación a través del TCR, mientras que los linfocitos T $\gamma\delta$ responden de manera similar a las células control.

2.4. MODULACIÓN Y RE-EXPRESIÓN DEL TCR

También quisimos estudiar la capacidad de las células con deficiencia parcial de CD3 δ de internalizar y posteriormente reexpresar el TCR. Como ya se explicó en la introducción, la activación del TCR

induce su propia internalización en un proceso dependiente de la fosforilación de las Tyr presentes en las cadenas constantes y de la Ser¹²⁶ de CD3 γ . Tras la internalización, la célula recupera sus niveles basales de expresión mediante procesos de reciclaje y síntesis *de novo* del TCR.

En primer lugar analizamos en linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ frescos la internalización del TCR tras estímulo. Para ello se aislaron PBL y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 durante 24h, posteriormente se analizó la expresión del TCR por citometría de flujo extracelular en células TCR $\alpha\beta$ (definidas como CD4⁺) y TCR $\gamma\delta$ y se calculó el porcentaje de expresión del TCR con respecto a las células sin estimular. Los resultados muestran que ambos linajes modulan la expresión del TCR en la misma medida que las células control (fig. R2.6A).

Para estudiar la modulación y posterior cinética de re-expresión del TCR se utilizaron linfocitos T $\alpha\beta$ cultivados del paciente AIII.1, se estimularon con anti-CD3 durante 24h y se analizaron los niveles de TCR en membrana a diferentes tiempos por citometría de flujo. La cinética de expresión del TCR muestra que a las 24h se internaliza un 60% del re-

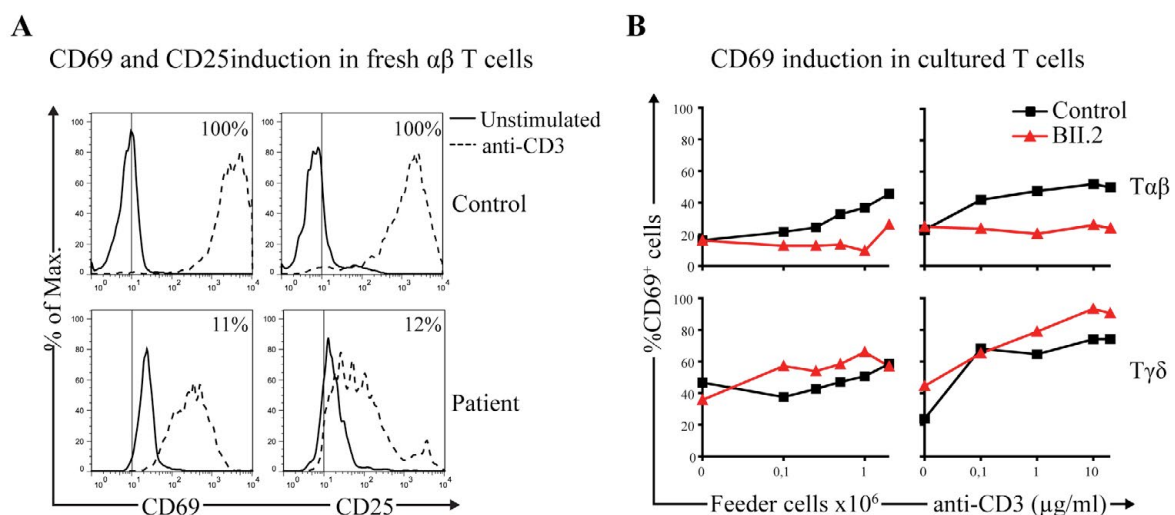


Figure R2.5: T cell activation. **A:** CD69 and CD25 induction were analyzed in fresh $\alpha\beta$ T (CD4⁺+CD8^{bright}) cells from patient BII.2 in response to 10 μ g/ml of anti-CD3 (UCHT-1). Numbers indicate % of induction vs control. **B:** CD69 upregulation was analyzed in cultured T cells in response to increasing concentrations of feeder cells or anti-CD3 (UCHT-1). 24h after stimulation the percentage of CD69⁺ cells was determined by flow cytometry in TCR $\alpha\beta$ (IP26⁺) or TCR $\gamma\delta$ (IMMU510⁺) cells.

ceptor tanto en las células control como en las del paciente (fig. R2.6B). Sin embargo la re-expresión del TCR en las células del paciente mostró una cinética ligeramente más lenta que la de las células control: mientras que en el control tras 4 días se habían recuperado los niveles normales de expresión, en las células del paciente sólo se había alcanzado un 80% de los niveles de expresión previos a la internalización.

En conclusión, la internalización del TCR mediada por anticuerpos anti-CD3 es normal en linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ de los dos pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ . Sin embargo, existe un retraso en la cinética de re-expresión del TCR, al menos para los linfocitos T $\alpha\beta$.

2.5. EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$ CD4⁺

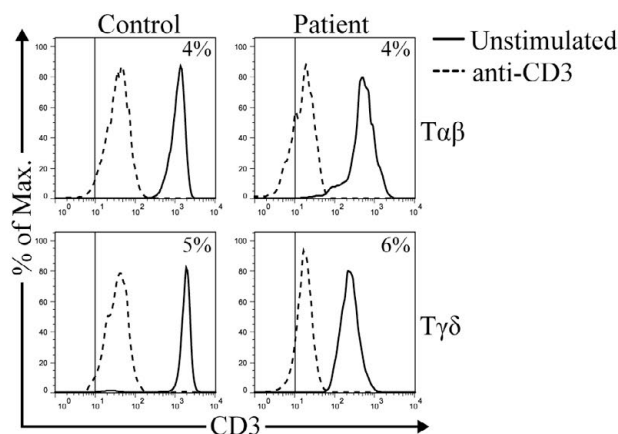
Un análisis más exhaustivo de los linfocitos T $\gamma\delta$ mostró una distribución normal de las subpoblaciones T $\gamma\delta$ principales (DN and CD8⁺) y un aumento en el número (alrededor de 10 veces más) y porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺. Esta subpoblación de lin-

focitos T $\gamma\delta$ supone menos del 1% de los linfocitos T $\gamma\delta$ en sangre periférica en controles sanos (3, 122), sin embargo en estos pacientes las células T $\gamma\delta$ CD4⁺ constituían el 15-32% de las $\gamma\delta$, y por tanto el 7-14% del total de linfocitos T en sangre periférica (fig. R2.7 A, B y C).

Para descartar que la expresión de CD4 por parte de las células T $\gamma\delta$ se debiese a un fenómeno transitorio como el descrito para algunas T $\alpha\beta$ (123), se cultivaron linfocitos T de los pacientes con células alogénicas (*feeder*) e IL-2. El análisis de la expresión de CD4 en las células T $\gamma\delta$ tras varios días de cultivo mostró que la expresión de CD4 por parte de las células $\gamma\delta$ era estable y no transitoria y que además el porcentaje de células $\gamma\delta$ CD4⁺ no solo se mantenía sino que incluso aumentaba (fig. R2.7D).

La existencia de estas células se confirmó además generando clones a partir de las líneas dependientes de células *feeder*. Entre los clones $\gamma\delta$ derivados de los cultivos se observó que los clones CD4⁺ eran predominantes (10 de 12) como puede observarse en

A TCR internalization in fresh $\alpha\beta$ T cells



B

TCR reexpression in cultured T cells

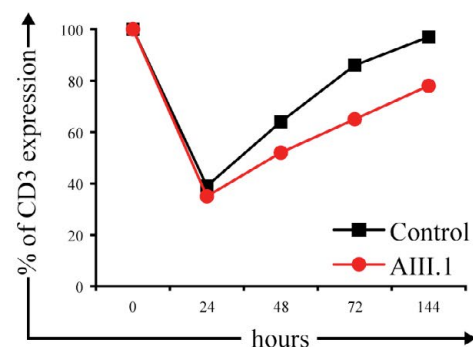


Figure R2.6: TCR dynamics. **A:** TCR internalization after 24h in response to 10 μ g/ml of plate bound anti-CD3 (UCHT-1) in primary $\alpha\beta$ (CD4⁺) and $\gamma\delta$ (11F2⁺) T lymphocytes from patient BII.2 and a control. Internalization was measured by flow cytometry using anti-CD3 mAb (SK7), number indicate % of expression vs unstimulated. **B:** TCR re-expression in cultured $\alpha\beta$ T (IP26⁺) cells from patient AIII.1 and a control. Cells were stimulated as in A, TCR re-expression was measured at different time points by flow cytometry using an anti-CD3 mAb (SK7). Data represent the percentage of CD3 expression relative to unstimulated cells (0h).

la Tabla R2.1. Para estudiar el origen de los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ CD4^+ se analizó la expresión de sus cadenas variables por citometría de flujo extracelular. Las líneas dependientes de células *feeder* se marcaron con varios anticuerpos específicos de distintas regiones variables del $\text{TCR}\gamma\delta$ (anti-V δ 1, V δ 2 y V γ 9) y se comparó la expresión de estos tres marcadores en células $\gamma\delta\text{CD4}^+$ y $\gamma\delta\text{CD4}^-$. Los resultados se representaron como porcentaje de células que expresan una determinada cadena TCR en cada una de las dos subpoblaciones, CD4^+ y CD4^- . Se observa

Table R2.1: T cell clones' phenotypes. Clones were generated from feeder-dependent T cell lines by limiting dilution, their phenotype was determined by extracellular flow cytometry.

	CONTROL	AIII.1	BII.2
$\text{CD4}^+ \alpha\beta$	8	22	1
$\text{CD8}^+ \alpha\beta$	-	-	-
DN $\gamma\delta$	-	-	2
$\text{CD4}^+ \gamma\delta$	-	3	7
$\text{CD8}^+ \gamma\delta$	-	-	-
TOTAL	8	25	10

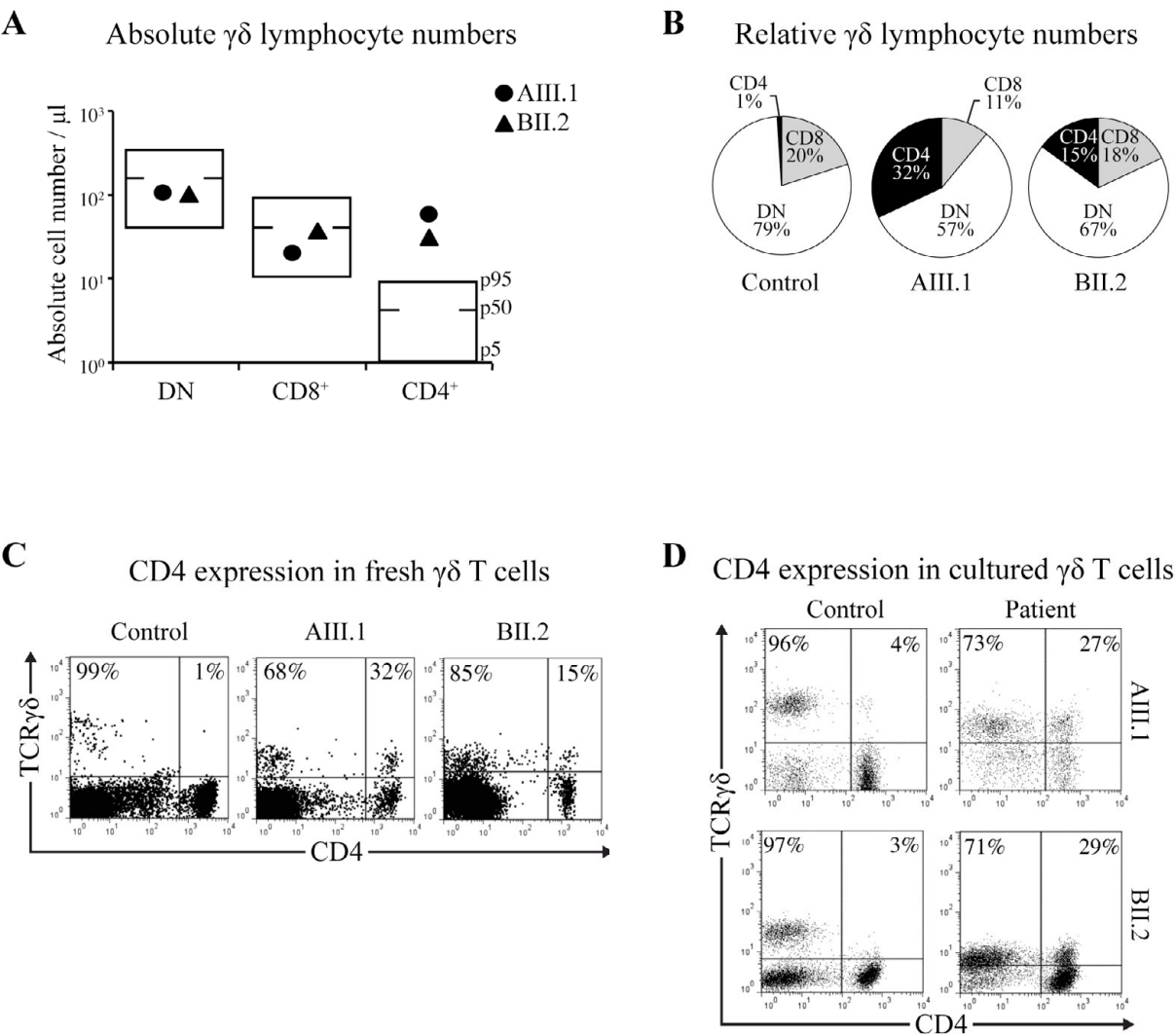


Figure R2.7: $\gamma\delta$ T lymphocyte analyses. **A:** Absolute DN, CD8^+ and CD4^+ $\gamma\delta$ T cell numbers in comparison with the normal age-matched distribution in percentiles. **B:** Relative $\gamma\delta$ T cell numbers. **C:** $\text{TCR}\gamma\delta^+$ cell distribution between CD4^- and CD4^+ subsets (upper quadrants and %) in fresh $\gamma\delta$ T cells. **D:** $\text{TCR}\gamma\delta^+$ cell distribution as in C in cultured T cell lines generated from PBMC and expanded weekly with irradiated allergenic feeder cells.

que aproximadamente el 80% de los linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$ en ambos pacientes son $V\delta 1$ y el 20% restante $V\delta 2$ (seguramente expresada junto con la cadena $V\gamma 9$); en la subpoblación $CD4^-$ también se observa mayor abundancia de células $V\delta 1^+$ (fig. R2.8). Las diferencias en el perfil de expresión de estos marcadores entre las células control y las células de los dos pacientes se deben a que el control utilizado, como era de esperar, no posee linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$, y además corresponde a un individuo adulto, por lo que la mayoría de sus linfocitos $\gamma\delta$ pertenecen a la subpoblación $V\gamma 9V\delta 2$. Sin embargo, en los dos pacientes, debido a su corta edad, predominan las células $V\delta 1^+$ (3). Estos resultados indican que ambas poblaciones de células $\gamma\delta$ son diversas y por tanto se descarta que los linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$ presentes en estos pacientes sean el resultado de una expansión clonal.

Por último, quisimos determinar si los linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$ aparecían también en otras inmunodeficiencias causadas por mutaciones en alguna de las cadenas invariantes del TCR, ya que podría ser que estas células se seleccionasen cuando existen defectos de

expresión del TCR. Para probar esta hipótesis, se estudiaron dos pacientes con defectos de expresión del TCR, uno con deficiencia de la cadena $CD3\gamma$ (paciente 5 de la tabla I.3) y otro con deficiencia de la cadena ζ (paciente 3 en la tabla I.3). El análisis por citometría de flujo de la expresión de $CD4$ en linfocitos $\gamma\delta$ mostró que la expansión de los linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$ era específica de la deficiencia parcial de $CD3\delta$, ya que estas células no aparecían en las deficiencias de $CD3\gamma$ o ζ (fig. R2.9).

Para intentar explicar el origen de la expansión de linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$ nos planteamos otra posible hipótesis, quizás estos linfocitos se estuviesen seleccionando en los pacientes debido a diferencias en la expresión del TCR en su superficie. Para analizar esta posibilidad se comparó la expresión del TCR entre los linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+$ y $CD4^-$ del paciente B. Se marcaron linfocitos $\gamma\delta$ recién aislados de sangre periférica con distintos anticuerpos anti- $CD3$ y se comparó por citometría de flujo la expresión del TCR en células $CD4^+$ y $CD4^-$ (fig. R2.10).

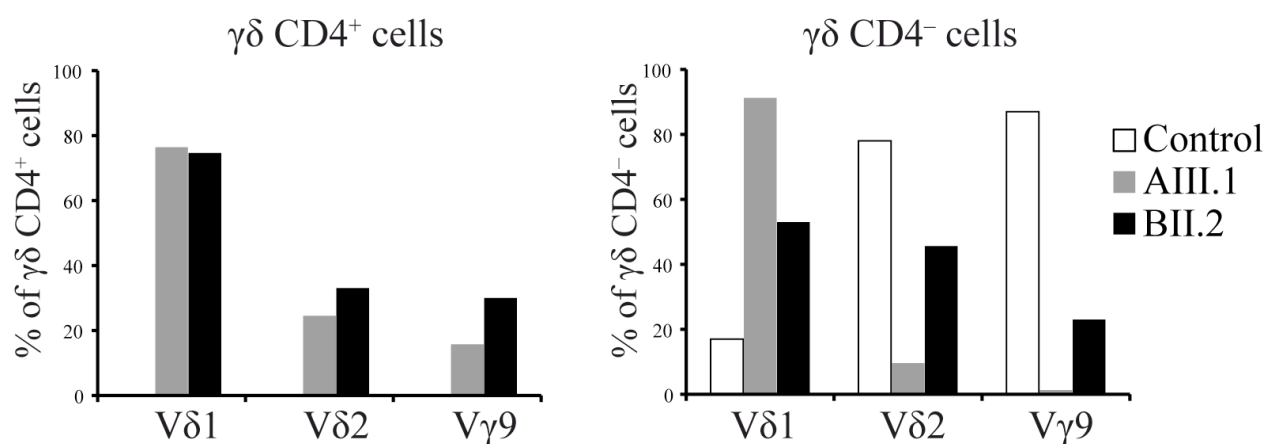


Figure R2.8: $V\delta 1$, $V\delta 2$ and $V\gamma 9$ usage within $CD4^+$ or $CD4^-$ $\gamma\delta$ T cell subsets. $V\delta 1$, $V\delta 2$ and $V\gamma 9$ expression was analyzed by flow cytometry using specific mAb in cultured $\gamma\delta$ $CD4^+$ or $CD4^-$ T cells. Bars represent the percentage of cells expressing the indicated variable TCR region.

Los resultados muestran que no existen diferencias cuantitativas en la expresión del TCR entre las dos subpoblaciones $\gamma\delta$ CD4⁺ y CD4⁻. Por tanto, la expansión de las células $\gamma\delta$ CD4⁺ no se puede atribuir a diferencias en la expresión del TCR con respecto a las que no expresan CD4.

2.6. FENOTIPO Y FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ CD4⁺

En primer lugar se analizó por citometría de flujo extracelular la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en células $\gamma\delta$ frescas del paciente A y se comparó la expresión de estos marca-

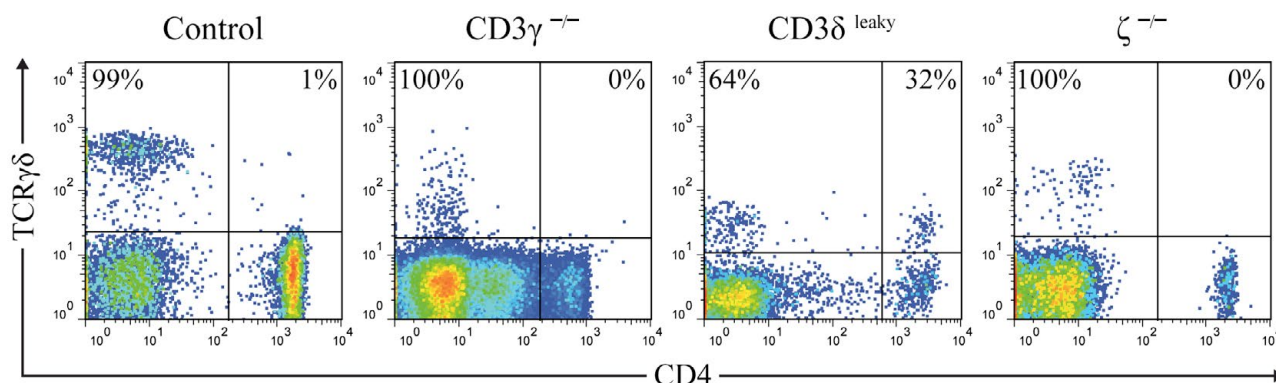


Figure R2.9: CD4 expression in $\gamma\delta$ T cells from 3 different invariant chain deficiencies. $\gamma\delta$ CD4⁻ and CD4⁺ T cell subsets (upper quadrants and %) in fresh PBMC from CD3 γ deficient, CD3 δ partial deficient (leaky) and ζ deficient patients, compared to a control.

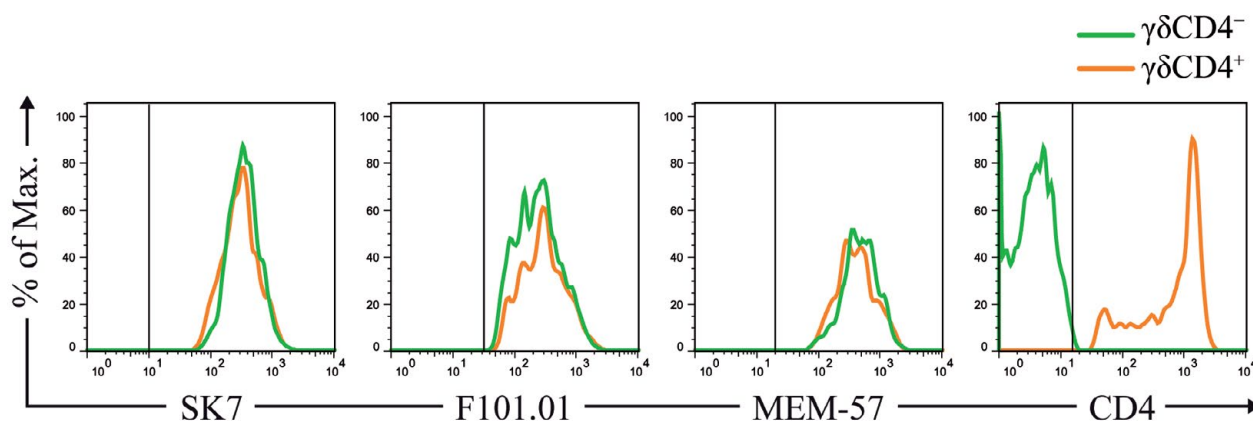


Figure R2.10: Comparative surface TCR expression in $\gamma\delta$ CD4⁺ and $\gamma\delta$ CD4⁻ T cells. Cells were stained with direct (SK7 and CD4) or indirect mAb (F101.01 and MEM57) followed by a fluorescent secondary antibody (anti-mouse PE), and analyzed by flow cytometry. Cells were gated as TCR $\gamma\delta$ ⁺ (IMMU510) and CD4⁺ or CD4⁻. Similar results were obtained for AIII.1 (not shown). Vertical lines indicate the background staining limit.

dores en la población $CD4^+$ frente a la $CD4^-$. Los resultados mostraron que los linfocitos T $\gamma\delta CD4^+$ exhibían un fenotipo pre-activado *ex vivo* ya que la expresión de estos dos marcadores de activación celular era 3 veces mayor que en células $\gamma\delta CD4^-$ (fig. R2.11A).

También se analizó en linfocitos T $\gamma\delta$ cultivados $CD4^+$ y $CD4^-$ del paciente B la capacidad de inducir la expresión de CD69 en respuesta a concentraciones crecientes de células *feeder* o anti-CD3. Las células se estimularon durante 24h y se analizó por citometría de flujo extracelular el porcentaje de células $CD69^+$. El análisis de los resultados mostró que las células $\gamma\delta CD4^+$ mostraban niveles de activación basal próximos al 100% y por tanto, eran incapaces de inducir más la expresión de CD69 tras activación a través de su TCR (fig. R2.11B). Sin embargo, las células $\gamma\delta CD4^-$ mostraban niveles de activación basal menores tal y como se había observado en células frescas y sí eran capaces de inducir la expresión del marcador de activación CD69.

En conclusión, las células $\gamma\delta CD4^+$ de los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ muestran un fenotipo preactivado tanto *ex vivo* como en cultivo

en comparación con las células $\gamma\delta CD4^-$ y son por tanto resistentes a la activación a través del TCR, al menos para la inducción de la expresión de CD69. Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a entender cuáles son los requerimientos mínimos para la expresión y función del TCR humano y para la selección de los linfocitos T en el timo. En el primer bloque de resultados se ha estudiado el impacto de la deficiencia inducida de CD3 γ o CD3 δ (las dos cadenas CD3 más parecidas) en la expresión y ensamblaje del TCR, mientras que en el segundo bloque se han caracterizado dos pacientes con deficiencia congénita parcial de la cadena CD3 δ . El estudio de estos pacientes puede ayudar a entender el papel de CD3 δ en el desarrollo y función de los linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$.

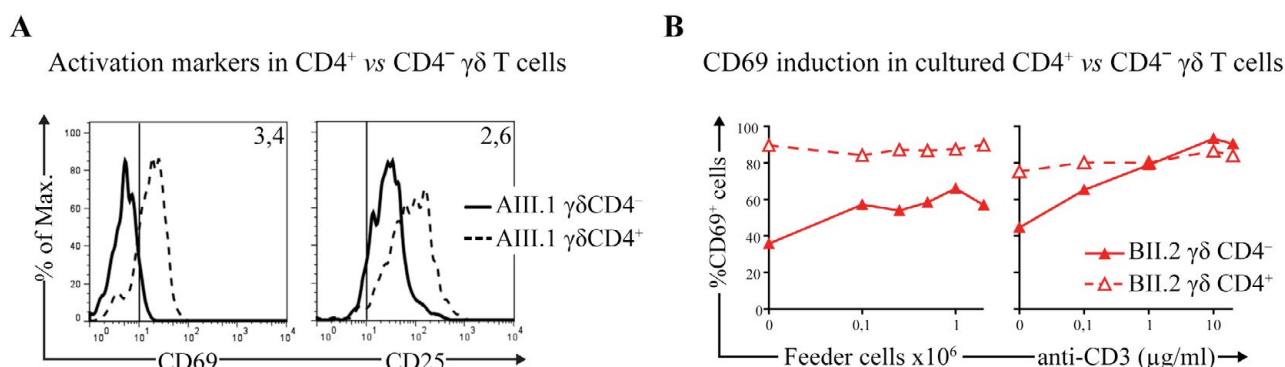


Figure R2.11: $\gamma\delta CD4^+$ T cell activation. **A:** Comparative expression of activation markers in $\gamma\delta CD4^+$ vs $CD4^-$ T cells. CD69 and CD25 expression were analyzed in fresh $\gamma\delta$ T cells from patient AIII.1. The numbers in each histogram indicate $CD4^+/CD4^-$ geoMFI ratios. **B:** T cell activation in cultured $\gamma\delta$ T cells. CD69 upregulation was analyzed in response to increasing concentrations of feeder cells or anti-CD3 (UCHT-1). 24h after stimulation the percentage of $CD69^+$ cells was determined by flow cytometry in $\gamma\delta CD4^+$ and $\gamma\delta CD4^-$ T cells.

Discusión

1. Deficiencia inducida de CD3 γ o CD3 δ (Knock-Down)

Para el estudio del ensamblaje y expresión del TCR en ausencia de CD3 γ o CD3 δ se generaron líneas KD (deficiencia inducida) para estas dos cadenas. El análisis de estas líneas puede contribuir en la descripción de los procesos que controlan el ensamblaje del TCR y los requerimientos para su expresión en la superficie celular.

1.1. RELEVANCIA DE LAS LÍNEAS KD PARA CD3 γ O CD3 δ

En este trabajo se han identificado 2 shRNA muy eficaces para el silenciamiento de CD3 γ o CD3 δ , gracias a los cuales se han generado dos líneas Jurkat donde se ha silenciado la expresión de CD3 γ o CD3 δ con niveles de silenciamiento próximos al 100% (fig. R1. 1 y 2).

La línea Jurkat shCD3 δ constituye la primera línea celular T humana carente de CD3 δ , y por tanto es de gran utilidad para el estudio del ensamblaje, maduración y expresión del TCR humano. Los ratones KO para CD3 δ y los pacientes deficientes de CD3 δ carecen de linfocitos T en periferia, ya que la ausencia de esta cadena impide que estas células se seleccionen en el timo; este hecho imposibilita el uso de las células deficientes naturales para el estudio del papel de CD3 δ en el ensamblaje y expresión del TCR. Los únicos linfocitos T deficientes en CD3 δ descritos hasta la fecha han sido clones de origen m μ rido (84, 124); su estudio mostró que no era posible la expresión del TCR en ausencia de esta cadena, lo que contrasta con lo observado en los ratones KO para CD3 δ , en los cuales se ha descrito que los timocitos sí son capaces de expresar el TCR en el estadio DP, aunque este TCR no per-

mite enviar las señales necesarias para la selección positiva (125).

La línea Jurkat shCD3 γ es quizás menos novedosa, ya que constituye el tercer caso de una línea celular T humana carente de CD3 γ , pero sin embargo es de gran interés porque puede ayudar a entender la discrepancia entre las dos líneas previamente descritas. En 1992 Carsten Geisler generó una línea Jurkat deficiente de CD3 γ (JGN, *Jurkat Gamma Negative*) mediante mutagénesis inducida por radiación- γ y posterior selección de clones TCR $^-$ (86). Por otro lado, y también en 1992, se identificó una familia española con ID causada por la deficiencia de la cadena CD3 γ ; los linfocitos T de estos pacientes son capaces de expresar el TCR en la superficie celular pese a no expresar la cadena CD3 γ . (81). Es decir, que existe una discrepancia entre las células mutantes naturales y mutantes artificiales, ya que las primeras pueden expresar el TCR sin CD3 γ mientras que las segundas no; es por eso que los resultados obtenidos con la línea shCD3 γ son de gran interés, ya que pueden ayudar a comprender esta discordancia.

La línea JGN se ha utilizado en numerosos trabajos como herramienta para identificar distintas regiones con importancia estructural y funcional presentes en la cadena CD3 γ . Por ejemplo, la introducción de construcciones quiméricas de CD3 γ y CD3 δ en esta línea ha demostrado que la región IC y TM de CD3 δ pueden sustituir a la de CD3 γ y que sin embargo sus regiones EC no son intercambiables (52). La introducción de cadenas CD3 γ mutadas en esta línea también ha permitido (i) identificar residuos importantes para la unión con CD3 ϵ y TCR β , (ii) el papel

del motivo di-L presente en el dominio IC en el reciclaje y ensamblaje del TCR y (iii) determinar que ni el dominio IC de CD3 γ ni los azúcares presentes en el dominio EC son esenciales para la expresión del TCR (71, 126, 127). Por tanto, pensamos que la línea Jurkat shCD3 δ podría utilizarse al igual que JGN para identificar regiones o residuos con funciones específicas en la cadena CD3 δ .

1.2. EFECTO DEL KD SOBRE LAS OTRAS CADENAS CD3

El silenciamiento de CD3 γ o CD3 δ provoca una ligera disminución (alrededor de un 20%) en los niveles de CD3 ϵ (fig. R1.2). La cadena CD3 ϵ forma dímeros con CD3 γ y CD3 δ y esta dimerización protege a las cadenas CD3 de ser transportadas al citosol para su degradación (ERAD). Al silenciar la expresión de CD3 γ o CD3 δ se reduce la capacidad de CD3 ϵ de formar dímeros, quedando probablemente CD3 ϵ en forma monomérica y por tanto susceptible de sufrir ERAD.

También se observa un aumento en los niveles de CD3 γ en la línea Jurkat shCD3 δ y una reducción en los niveles de CD3 δ en la línea shCD3 γ (fig. R1.2 y R1.3). Esto probablemente se deba a que la vida media en el RE del dímero $\gamma\epsilon$ es mayor a la del dímero $\delta\epsilon$ (23, 69, 128, 129).

1.3. LA AUSENCIA DE CD3 γ O CD3 δ IMPIDE LA EXPRESIÓN DEL TCR EN MEMBRANA

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.1 de esta discusión, nunca se había podido estudiar la expresión del TCR en ausencia de CD3 δ en linfocitos T humanos. Además, los dos sistemas de células T humanas carentes de CD3 γ arrojaban resultados contradictorios. También existen varios estudios en sistemas heterólogos donde se transfectan las cadenas que constituyen el TCR en líneas no T: dos estudios afirman que CD3 γ o CD3 δ no son indispensables para la expresión del TCR de ratón en la superficie celular (41, 42); otro estudio, que empleó las cadenas humanas, determinó que CD3 δ era imprescindible para la expresión del TCR en superficie (66); y un último estudio determinó que para la asociación del TCR hexamérico humano con ζ eran necesarias tanto CD3 γ como CD3 δ (31).

Todas estas estrategias ofrecen resultados contradictorios y además presentan ciertos inconvenientes. Por un lado, los sistemas heterólogos estudian el ensamblaje del TCR en células no T y aunque es posible observar expresión del TCR cuando se transfectan todas las cadenas, los mecanismos que regulan este proceso podrían ser distintos a los presentes en los linfocitos T. Por otra parte, los estudios realizados en ratones KO o en pacientes deficientes de alguna de las cadenas tienen el inconveniente de la selección tímica, que podría estar seleccionando clones poco probables y capaces de expresar el TCR o bien podría bloquear el desarrollo de linfocitos T con un TCR que se expresa pero que carece de alguna de las cadenas. Por último, la línea JGN tampoco ofrece un resultado concluyente, ya que estas células se seleccionaron para no expresar el TCR. Sin embargo, el sistema presentado en esta tesis evita todos estos inconvenientes: las células empleadas son linfocitos T y por tanto poseen toda la maquinaria típica de las células T, el silenciamiento se produce en linfocitos T maduros, de modo que se evita el efecto de la selección tímica y por último no se ejerce ningún tipo de selección que condicione el resultado final.

El análisis de la expresión del TCR en superficie por citometría de flujo extracelular (fig. R1.4) y por microscopía de fluorescencia (fig. R1.5) en las líneas Jurkat shCD3 γ y shCD3 δ demostró que no es posible la expresión del TCR humano en ausencia de estas cadenas. Ninguno de los anticuerpos empleados en los experimentos de citometría de flujo extracelular fue capaz de detectar el TCR; además, el análisis por microscopía de fluorescencia mostró que en las líneas KD la cadena TCR β se expresaba a nivel intracelular pero no extracelular.

También se comparó la unión de un panel de anticuerpos anti-TCR y anti-CD3 a las células Jurkat shCD3 γ y HVS $\gamma^{-/-}$, los resultados obtenidos muestran que las células HVS $\gamma^{-/-}$ expresan TCR en su membrana sin la cadena CD3 γ y que estos TCR con estequiometría $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2$ tienen alterados ciertos epítopos reconocidos por algunos anticuerpos, como ya se había sido descrito (80). Sin embargo, en las cé-

lulas shCD3 γ no se observó tinción con ninguno de los anticuerpos empleados, de modo que pudimos descartar que la falta de unión de estos mA b se debiese a diferencias epitópicas en el TCR.

Para corroborar los datos obtenidos con las secuencias shCD3 γ -1 y shCD3 δ -3, se analizó también la expresión del TCR en líneas tratadas con el resto de secuencias shRNA (un total de 5 secuencias diferentes para cada cadena). Las distintas secuencias producían intensidades de silenciamiento diferentes y se vio que correlacionaban con la disminución de expresión del TCR en la superficie celular. Por consiguiente, estos resultados confirman los datos obtenidos con las secuencias seleccionadas, y demuestran que la falta de expresión del TCR en las líneas KD es fruto del silenciamiento y no de efectos inespecíficos (fig. R1.6). Además, estos resultados permitieron crear un modelo con el que comparar los resultados obtenidos con otras células T.

Nuestros datos demuestran que la pérdida de CD3 γ afecta de manera diferencial a las células Jurkat (deficiencia inducida) frente a las células de individuos deficientes en CD3 γ (deficiencia natural). Para averiguar si este efecto diferencial se debía a alguna característica de las células Jurkat, se estudió el efecto del silenciamiento sobre la expresión del TCR en otras células T. Se analizaron células Jurkat que por-

tan un TCR diferente (Jurkat CH7C17), la línea T HPB-ALL y PBL de individuos sanos. En todos los casos se observó que la disminución en los niveles intracelulares de CD3 γ o CD3 δ correlacionaba con una disminución de la expresión del TCR en la superficie celular. Estos datos indican que la incapacidad de Jurkat E6-1 de expresar el TCR en ausencia de CD3 γ o CD3 δ no depende de las cadenas TCR que expresa, ni se restringe a esta línea celular, ya que también se observa en la línea HPB-ALL y en PBL de individuos sanos (fig. R1.11). Los datos obtenidos con otras células T distintas de Jurkat E6-1 se ajustaban al modelo que generamos con las distintas secuencias shRNA y por tanto demostraban que el efecto del silenciamiento es el mismo sobre todas las células T estudiadas (Jurkat E6-1, Jurkat CH7C17, HPB-ALL y PBL).

Los resultados obtenidos en esta tesis mediante silenciamiento de CD3 γ reproducen lo descrito por Geisler en el sistema JGN (86); CD3 γ es imprescindible para la expresión del TCR humano. Pero contrastan con lo observado en los pacientes deficientes de CD3 γ (80), cuyos linfocitos T sí son capaces de expresar el TCR sin esta cadena (fig D1.1). La capacidad de los linfocitos de pacientes deficientes de CD3 γ de expresar un TCR (tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$) que no incorpora CD3 γ es todavía un misterio. Se podría argumentar que estos pacientes presentan al-

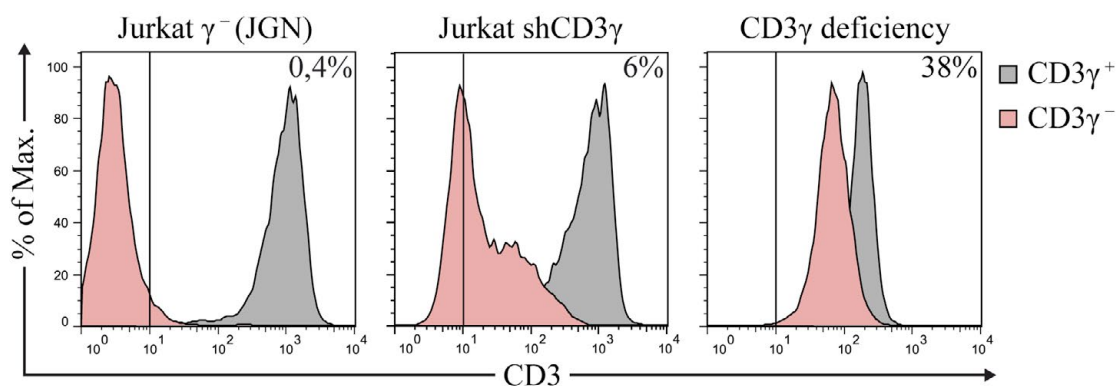


Figure D1.1: Surface TCR expression in three CD3 γ -deficient T cells. Jurkat γ negative (JGN) and Jurkat shCD3 γ lose surface TCR expression, whereas congenital γ -deficient T cells express high TCR levels.

gún polimorfismo en alguna otra cadena del TCR que permitiera el ensamblaje con dos dímeros $\delta\epsilon$, o en alguna chaperona que de otro modo retendría el complejo en el RE, pero estas hipótesis son muy improbables, ya que se han descrito un total de 7 pacientes que provienen de 4 familias diferentes y que portan 3 mutaciones distintas. Además, la introducción de la cadena CD3 γ en las células de estos pacientes hace que se alcancen niveles de expresión del TCR próximos a la situación normal, demostrando que el único defecto que presentan estas células es la falta de CD3 γ (130), y que no existen mecanismos bioquímicos de sobreexpresión del TCR en dichas células. Nuestros datos sugieren que estos TCR sin CD3 γ son fruto de las presiones selectivas durante el desarrollo tímico, y por tanto, que las consecuencias de la pérdida de CD3 γ antes o después de pasar por el timo son diferentes. Quizás durante la selección tímica se estén seleccionando aquellas cadenas TCR β o TCR γ capaces de asociarse con un dímero $\delta\epsilon$ y que en condiciones normales serían muy infrecuentes. En este mismo sentido, los ratones KO para CD3 γ y CD3 δ que expresan un transgén de CD3 δ humano (CD3 $\gamma^{-/-}$ CD3 δ -humanizado) también son capaces de expresar el TCR con dos dímeros $\delta\epsilon$, a diferencia de los ratones CD3 $\gamma^{-/-}$, es decir, que la cadena CD3 δ humana, a diferencia de la murina, sí es capaz de reconstituir la selección de los linfocitos T en el timo en los ratones deficientes en CD3 γ (131).

Los resultados obtenidos silenciando CD3 δ en células T van en la misma línea que lo observado por M. Call en microsomas de células B, que indican que en ausencia de CD3 δ se inhibe la asociación con $\zeta\zeta$ (31) y por lo observado por P. Delgado en células COS (66). También concuerdan con los defectos de expresión del TCR en pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ (110, 132) y con el bloqueo total del desarrollo T en la deficiencia completa de esta cadena en humanos y en ratón. Además, corroboran lo observado en líneas murinas deficientes en CD3 δ , donde tampoco es posible la expresión del TCR (84, 124).

En conjunto, los datos obtenidos con las líneas KD indican que para la expresión del TCR son necesarias tanto CD3 γ como CD3 δ . Este hecho imposibilitó el análisis de la señalización a través de receptores carentes de CD3 γ o CD3 δ , como habíamos planteado en los objetivos de este trabajo. También nos habíamos propuesto comprender por qué, y pese a la gran homología entre CD3 γ y CD3 δ , las consecuencias clínicas de la deficiencia de una o la otra eran tan dispares; la deficiencia completa, e incluso la parcial, de CD3 δ son clínicamente más graves que la deficiencia completa de CD3 γ . Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el silenciamiento de CD3 γ no reproduce los efectos sobre la expresión del TCR que se observan en la deficiencia congénita de dicha cadena. Sin embargo, parece que el KD de CD3 δ sí reproduce lo observado en

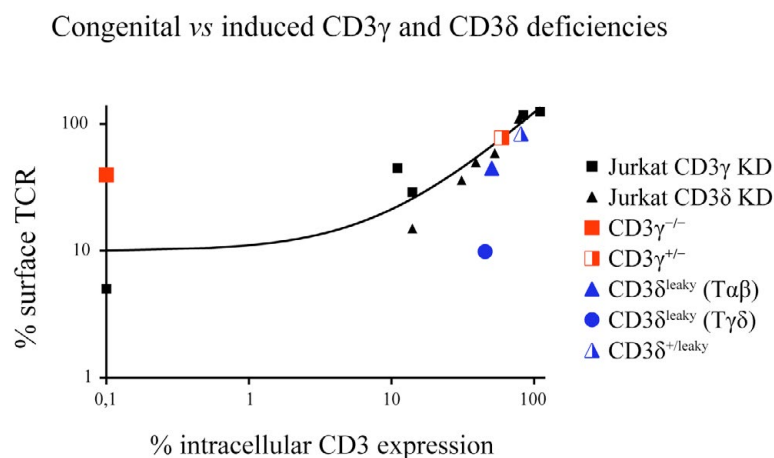


Figure D1.2: Surface TCR expression in congenital and induced (KD) CD3 γ and CD3 δ deficiencies, both partial and complete. Induced deficiencies in black from fig R1.6 are plotted with the data obtained with congenital CD3 γ (red) or CD3 δ (blue) deficiencies.

los linfocitos T $\alpha\beta$, pero no $\gamma\delta$, de los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ (fig. D1.2). La comparación con la deficiencia completa de CD3 δ no se ha podido realizar porque estos pacientes presentan linfopenia T muy grave que imposibilita el estudio de la expresión del TCR. Nuestros resultados no nos permiten determinar la causa de esta discrepancia, ya que el efecto del KD, a diferencia de las deficiencias congénitas, sobre la expresión del TCR fue similar para las dos cadenas. Seguramente, estas diferencias se deban a distintas presiones selectivas en el timo actuando sobre los timocitos en desarrollo, por lo que el estudio de la deficiencia inducida en células maduras impide abordar esta cuestión.

Por último, cabe destacar que nuestras observaciones descartan la existencia de las isoformas del TCR descritas por algunos grupos (32, 33, 37, 38) y van a favor del modelo estequiométrico propuesto por M. Call (24), donde CD3 γ y CD3 δ formarían parte de un mismo TCR. Si la existencia de isoformas con estequiometría de las cadenas invariantes $(\gamma\epsilon)_2(\zeta)_2$ y $(\delta\epsilon)_2(\zeta)_2$ fuese cierta, en nuestras células KD se observaría una bajada de expresión del 50% y no próxima al 100% como la que observamos en este trabajo.

1.4. LOS TCR QUE NO INCORPORAN CD3 γ O CD3 δ QUEDAN RETENIDOS EN EL RE

Tras determinar que no era posible la expresión del TCR en la superficie celular en ausencia de CD3 γ o CD3 δ procedimos a analizar en qué paso del ensamblaje y/o transporte se producía el bloqueo.

En primer lugar demostramos mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (siguiendo dos estrategias diferentes) que el homodímero $\zeta\zeta$ no se asociaba con el resto de cadenas del TCR si faltaban CD3 γ o CD3 δ (fig. R1.7). Estos datos concuerdan con lo observado en líneas T murinas deficientes en CD3 δ (84) y líneas T humanas deficientes en CD3 γ (86), así mismo también coinciden con los experimentos realizados en microsomas B con cadenas TCR humanas (31).

Como se ha descrito que la asociación del TCR hexamérico con $\zeta\zeta$ tiene lugar en el aparato de Gol-

gi, quisimos estudiar si el bloqueo en el ensamblaje se debía a que los TCR carentes de CD3 γ o CD3 δ no podían asociarse con ζ o bien se debía a un bloqueo en la salida del TCR desde el RE hacia el aparato de Golgi. Siguiendo dos estrategias diferentes determinamos que las cadenas que forman el TCR no se exportaban al aparato de Golgi, es decir, quedaban retenidas en el RE. En primer lugar analizamos la localización subcelular de TCR β y ζ por microscopía de fluorescencia. Se ha descrito que la cadena ζ se exporta independientemente del resto de cadenas del TCR al aparato de Golgi, donde se acumula y es relativamente estable (58). Es decir, que la localización intracelular de ζ es principalmente el aparato de Golgi. El patrón de localización de TCR β y ζ por microscopía de fluorescencia mostró que ambas proteínas no colocalizaban en el mismo compartimento subcelular en las líneas KD pero sí en la línea control, indicando que TCR β no sale del RE cuando faltan CD3 γ o CD3 δ (fig. R1.8).

Para corroborar estos resultados estudiamos la susceptibilidad de CD3 γ y CD3 δ al tratamiento con la enzima EndoH, pues estas 2 glicoproteínas poseen oligosacáridos que maduran y se procesan en el aparato de Golgi donde adquieren resistencia a la digestión por la glicosidasa EndoH. El estudio de la susceptibilidad a EndoH mostró que en ausencia de CD3 γ la cadena CD3 δ no se hacía resistente a EndoH y en ausencia de CD3 δ la cadena CD3 γ tampoco adquiría resistencia a la digestión por esta enzima (fig. R1.9). Por tanto, cuando falta CD3 γ o CD3 δ los TCR no se exportan hacia el aparato de Golgi ya que quedan retenidos en el RE. Estos datos además explican por qué en la línea shCD3 δ no se observaba la forma tg de CD3 γ (fig. R1.2), ya que esta forma más madura de CD3 γ se genera en el aparato de Golgi.

El bloqueo en la salida del RE de los TCR deficientes en CD3 γ y CD3 δ que observamos en nuestras líneas KD, coincide con lo observado en la línea humana deficiente en CD3 γ (86) y de ratón deficiente en CD3 δ (124). También se ha observado este bloqueo en la salida de las cadenas que forman el TCR en líneas deficientes para TCR α o TCR β tanto de origen humano (133, 134) como de ratón (128), sin

embargo, en ausencia de la cadena ζ , los TCR parciales salen del RE y alcanzan el aparato de Golgi, pero son desviados hacia la ruta de degradación lisosomal y por tanto tampoco alcanzan la superficie celular (68).

En siguiente lugar estudiamos la estequiometría de los TCR ensamblados en el RE de las líneas KD. Para determinar las relaciones estequiométricas entre las distintas cadenas se realizaron experimentos de co-IP del TCR y las cadenas CD3. Las cuantificaciones obtenidas por WB no permiten determinar la cantidad relativa de unas cadenas respecto a otras, por lo que asumimos que la estequiometría del TCR en las células shNT es $\alpha\beta\delta\epsilon\gamma\epsilon$ y relativizamos las cuantificaciones obtenidas en las líneas KD a las células shNT (fig. R1.10). De este modo, se observa que en ausencia de CD3 γ coprecipitan junto con TCR β las cadenas CD3 ϵ y CD3 δ , pero las cuantificaciones de las bandas demuestran que la cantidad de estas cadenas es aproximadamente la mitad que en las células control. La interpretación de estos datos nos lleva a pensar que en las líneas shCD3 γ se for-

man complejos con estequiometría $\alpha\beta\delta\epsilon$ y que además estos complejos parciales parecen ser menos estables que el TCR hexamérico presente en las líneas shNT (fig. D1.3). Además, estos resultados también demuestran que la cadena TCR β sólo puede unirse al dímero $\gamma\epsilon$ y es incapaz de unir un dímero $\delta\epsilon$. Por tanto, nuestros datos corroboran lo observado por el grupo de Carsten Geisler en la línea JGN (86) y por el sistema heterólogo descrito por Matthew Call (31), donde ya se había descrito que en ausencia de CD3 γ se formaban complejos con estequiometría $\alpha\beta\delta\epsilon$ que quedaban retenidos en el ER. Sin embargo, nuestros datos (al igual que los de los dos estudios anteriores) difieren con el comportamiento del TCR en los pacientes deficientes de CD3 γ , ya que en este caso TCR β sí es capaz de unirse al dímero $\delta\epsilon$ (40).

El análisis del ensamblaje del TCR en la línea Jurkat shCD3 δ mostró una situación diferente. La cuantificación de las co-IP demostraron que junto con TCR β coprecipitaba igual cantidad de CD3 ϵ que en las células control, pero casi el doble de CD3 γ . Estos datos nos inducen a pensar que en estas líneas

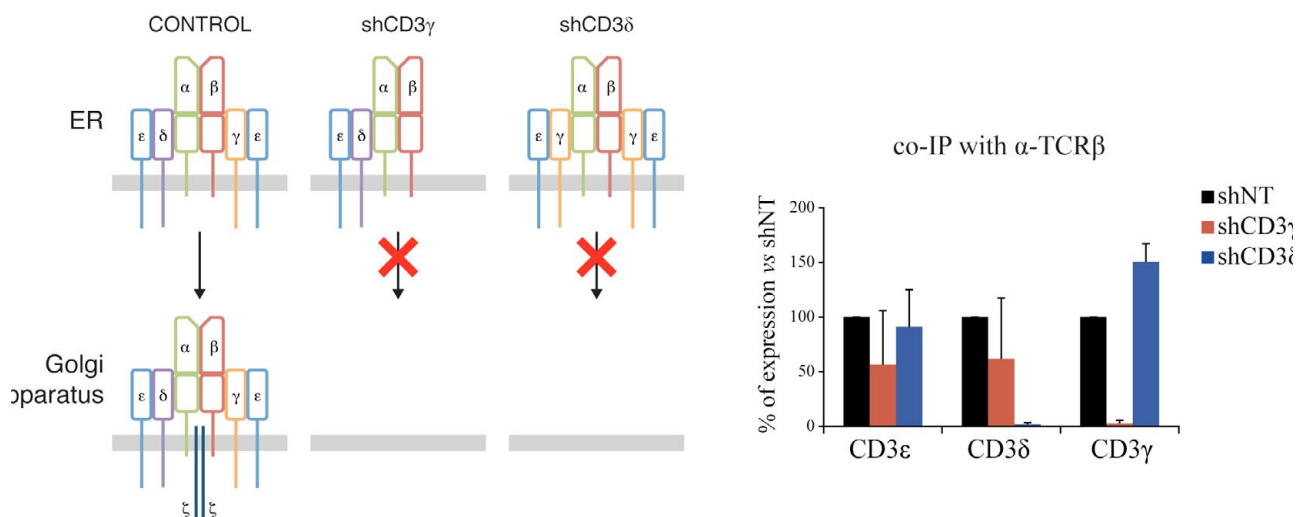


Figure D1.3: A model for TCR assembly and ER retention in KD cells. Left: in the absence of CD3 γ , partial tetrameric TCR are assembled and retained in the ER. When CD3 δ is missing, hexameric TCR are synthesized with the aberrant stoichiometry $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$ but are also retained in the ER. **Right:** quantifications from figure R1.10 of TCR β and CD3 co-IP in which the model is based.

KD para CD3 δ se ensamblan TCR hexaméricos con estequiometría de las cadenas invariantes $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$. Estos datos también indican que la cadena TCR α es más promiscua que TCR β y podría unirse tanto a dímeros $\delta\epsilon$, como a dímeros $\gamma\epsilon$ cuando CD3 δ no está presente (fig. D1.3); quizás esta capacidad de TCR α de unir dímeros $\gamma\epsilon$ esté relacionada con el acúmulo de dímeros $\gamma\epsilon$ en las líneas shCD3 δ discutido en el apartado 1.2 de esta discusión. Curiosamente, nuestros datos no coinciden con los obtenidos por Matthew Call en su sistema de microsomas derivados de células B (31). Este trabajo postula que la cadena que presenta mayor promiscuidad por los distintos dímeros CD3 es la cadena TCR β , y no TCR α como indican nuestros resultados. En este mismo artículo también se afirma que en ausencia de CD3 δ se reduce drásticamente el ensamblaje del TCR y según estos resultados establecen un modelo de ensamblaje en el que, para la unión del dímero $\gamma\epsilon$ es imprescindible la previa unión al complejo del dímero $\delta\epsilon$ (fig. D1.4, fila superior). Nuestros resultados no concuerdan con este modelo de ensamblaje, ya que en ausencia de CD3 δ no sólo no se inhibe la unión del

dímero $\gamma\epsilon$, si no que además es posible la unión de 2 de estos dímeros. Por tanto, proponemos un nuevo modelo en que la unión del dímero $\delta\epsilon$ a TCR α no es necesariamente el primer paso en el ensamblaje, si no que puede también comenzar con la unión del dímero $\gamma\epsilon$ a TCR β (fig. D1.4). El sistema de microsomas derivados de células B donde se transfectan las cadenas TCR ha permitido determinar las relaciones estequiométricas entre las distintas cadenas del TCR, pero quizás no sea posible reproducir adecuadamente todos los factores que intervienen en el ensamblaje del TCR. Creemos que los datos generados con nuestro sistema de células T pueden acercarse más a la situación fisiológica.

Aún no hemos podido identificar los factores responsables de la retención de estos TCR parciales o con estequiometría alterada en el RE. Sin embargo, y basándonos en la bibliografía, proponemos las siguientes hipótesis: los TCR tetraméricos presentes en las líneas shCD3 γ seguramente no se exportan hacia el aparato de Golgi debido a que al no ensamblarse el TCR en forma de hexámero, las señales

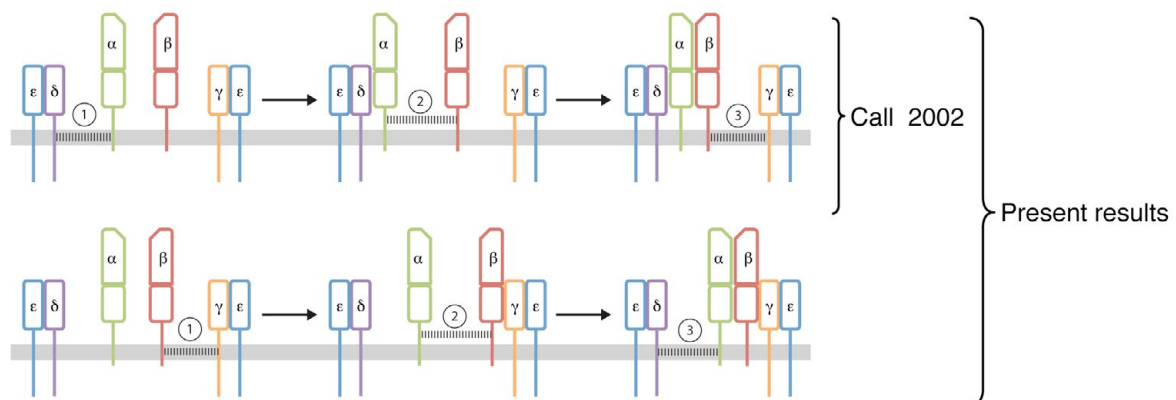


Figure D1.4: ER assembly model for hexameric TCR. With our data obtained in CD3 γ and CD3 δ KD cells, we propose a new model where assembly of the hexameric TCR can start with the interaction of either $\delta\epsilon$ (top) or $\gamma\epsilon$ (bottom) dimers to TCR chains, not only $\delta\epsilon$ as postulated earlier (31).

de retención en el RE presente en las cadenas no quedan enmascaradas (62, 63). Sin embargo, en las líneas shCD3 δ sí llegan a formarse TCR hexaméricos, podría ser que con esta nueva estequiometría, y pese a formarse el hexámero, no se enmascaren apropiadamente todas las señales de retención en el RE (fig. D1.5). De hecho, experimentos en células COS mostraron que en ausencia de la cadena CD3 δ era posible la expresión del TCR en membrana, siempre que se mutase la señal de retención en el RE presente en CD3 ϵ (66). Otro posible mecanismo sería la unión de alguna chaperona, que además de asistir en el plegamiento, estuviese reteniendo a estos TCR con estequiometría alterada. Actualmente se están llevando a cabo experimentos de co-IP del TCR y distintas chaperonas para intentar determinar si éstas son responsables de la retención en el RE.

Por último, ahondar en el hecho de que nuestros resultados no son compatibles con un escenario en que en la superficie de las células existan 2 isotipos diferentes de TCR: $\alpha\beta(\gamma\epsilon)_2$ y $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2$ (38). Tanto el análisis de la expresión del TCR en superficie como los experimentos de co-IP indican que estas isoformas no llegarían a la superficie, y en el caso de la isoforma $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2$, ni siquiera parece que su síntesis sea posible cuando se elimina CD3 γ en células maduras. Nuestros resultados son compatibles con un modelo de estequiometría del TCR $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon$.

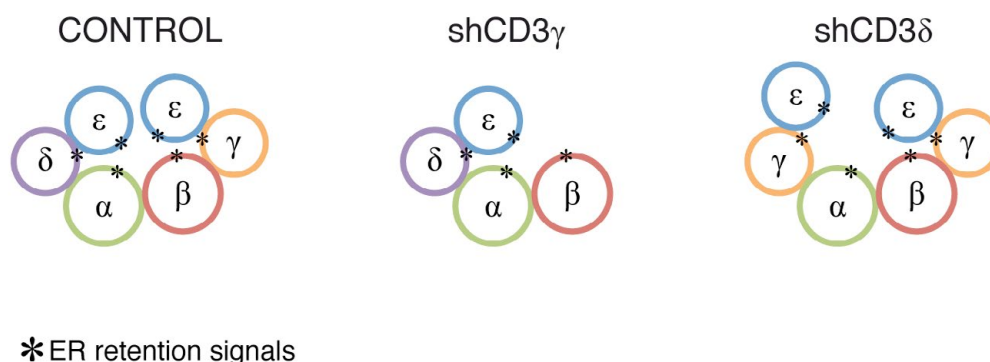


Figure D1.5: Model of inactivation of ER retention signals. All TCR chains have at least one functional retention signal (asterisks). This system guarantees that only fully assembled TCR are expressed at the cell surface. The ER retention signals in CD3 γ and CD3 δ are overridden upon dimerization with CD3 ϵ , while CD3 ϵ , TCR α and TCR β retention signals would be overridden upon hexamerization of a full TCR. Our results may be adapted to this model as follows. The tetrameric TCR assembled in shCD3 γ -treated cells would have retention signals exposed (center), whereas the hexameric TCR present in shCD3 δ -treated cells these signals may not be overridden due to an open conformational structure (left). Both are shown to be actively retained in the ER.

2. Deficiencia parcial de CD3 δ

El estudio de las deficiencias de las cadenas que forman el TCR ha contribuido en el conocimiento que tenemos sobre ellas. En esta segunda parte hemos analizado dos pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ , su estudio puede contribuir a esclarecer el papel que juega la cadena CD3 δ en la expresión y función del TCR y en la selección de los linfocitos T en el timo.

2.1. LA EXPRESIÓN DEL TCR $\gamma\delta$ SE REDUCE MÁS QUE LA DEL TCR $\alpha\beta$

La deficiencia parcial de CD3 δ descrita en este trabajo provoca una disminución en la cantidad de esta cadena del 50% en comparación con células control. Se ha demostrado por citometría de flujo intracelular que esta disminución es similar en los linajes T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Sin embargo, el impacto de la mutación sobre la expresión del TCR en membrana es diferente en ambos linajes, los linfocitos T $\alpha\beta$ presentan una disminución del 50%, mientras que en los T $\gamma\delta$ la disminución es del 90% (fig. R2.3). Estos resultados

se han observado utilizando diferentes anticuerpos anti-CD3 así como anti-TCR y tanto en células primarias como en células cultivadas.

Los ensayos realizados con linfocitos T primarios de individuos sanos en los que se silenció la expresión de CD3 δ revelaron que las diferencias de expresión entre los dos linajes no se debían a distintos requerimientos para el ensamblaje del TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, ya que el silenciamiento de CD3 δ afectaba por igual a los ambos linajes (fig. R2.4). Estos datos nos inducen a pensar que las diferencias en la expresión del TCR $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ que observamos en los pacientes se deben al efecto de la selección tímica, ya que no se observan cuando se silencia CD3 δ en células maduras. De hecho, el análisis de otras deficiencias parciales (135) indica esta misma tendencia, cuando disminuye la disponibilidad de CD3 δ o CD3 γ la expresión del TCR $\gamma\delta$ se ve más afectada que la del TCR $\alpha\beta$ (fig. D2.1). Estas diferencias son significativas en el

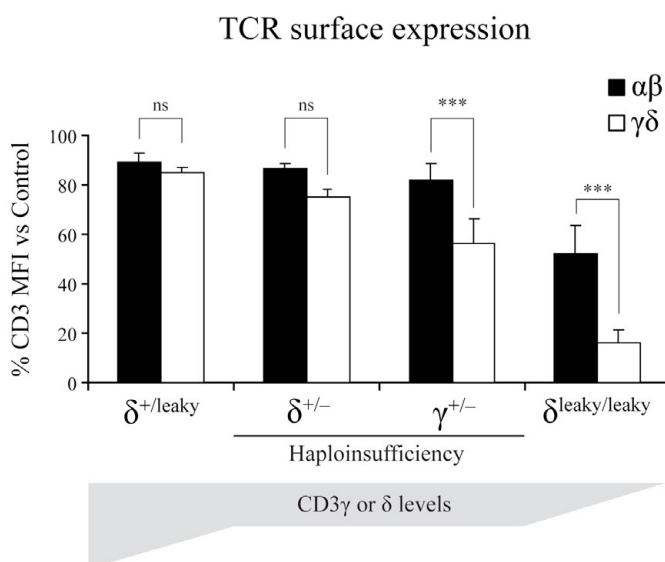


Figure D2.1: Surface TCR expression in individuals with different levels of CD3 δ or CD3 γ protein. Black and white bars are % surface $\alpha\beta$ TCR or $\gamma\delta$ TCR expression, respectively, compared to controls. CD3 $\delta^{leaky/leaky}$ is partial CD3 deficiency. Data are mean values + SD. Asterisks indicate significant differences as compared with controls after Student's *t*-test ($p < *0.05$; $**0.01$ or $***0.001$; ns: not significant).

caso de los 2 pacientes aquí descritos ($\delta^{leaky/leaky}$ en la gráfica) y para la haploinsuficiencia de $CD3\gamma$ ($\gamma^{+/-}$); y aunque no son significativas en el caso de $CD3\delta^{+/-}$ y $CD3\delta^{+/leaky}$, se observa una tendencia en el mismo sentido. Además, se observa una tendencia clara, las diferencias entre la expresión del TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ se hacen más evidentes cuánto más se limita la disponibilidad de la cadena. Por otra parte, cabe destacar que en igualdad de condiciones las diferencias son más intensas cuando la cadena que falta es $CD3\gamma$.

Los datos descritos en esta tesis y los recogidos por M. Muñoz-Ruiz (135), parecen indicar que existe una diferente dependencia en los niveles de TCR para la selección tímica de los linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. En el caso del linaje $\alpha\beta$, la selección tímica seleccionaría preferentemente aquellas células con mayores niveles de expresión del TCR, mientras que las células $\gamma\delta$ se seleccionarían sin importar tanto los niveles de expresión del TCR y por tanto permitiendo la selección de linfocitos T $\gamma\delta$ con bajos niveles de expresión del TCR.

De hecho, el análisis de la expresión del TCR en linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ de individuos sanos muestra que la distribución de los niveles de expresión del TCR en los linfocitos T $\gamma\delta$ es mucho más heterogénea que la de los $\alpha\beta$ (fig. D2.2). Este hecho apoyaría la teoría de que el control que ejerce la selección tímica sobre

la expresión del TCR $\gamma\delta$ es mucho más laxa que el que ejerce sobre el TCR $\alpha\beta$.

2.2. BLOQUEO EN EL DESARROLLO T $\alpha\beta$ PERO NO T $\gamma\delta$

Con respecto al desarrollo de las células T, los pacientes mostraban una linfopenia $\alpha\beta$ muy severa y sin embargo números normales de linfocitos T $\gamma\delta$ (fig. R2.1 y D2.3B). Es decir, los pacientes presentaban un fenotipo T $\alpha\beta^-$ T $\gamma\delta^+$, este fenotipo es poco común y solamente se ha descrito en pacientes con deficiencia parcial de $CD3\delta$ (110) y en pacientes con deficiencia de TCR α (115). Es de esperar que en ausencia de TCR α sólo el linaje $\alpha\beta$ se vea afectado, pero cuando la cadena que está disminuida forma parte de los dos receptores es sorprendente que sólo uno de los linajes esté perjudicado.

En algunos casos de SCID se han descrito expansiones clonales de células $\gamma\delta$ relacionadas con infecciones por CMV (121, 136), pero no parece ser el caso de nuestros pacientes, ya que en el paciente AIII.1 se excluyó la infección por CMV (118). Además el estudio de la clonalidad de los segmentos génicos V δ 1, V δ 2 y V δ 3 mostró una clonalidad normal de las células $\gamma\delta$ descartando así posibles expansiones clonales (fig. R2.2).

Por tanto, la deficiencia parcial de $CD3\delta$ afecta de manera muy grave a la selección de los linfocitos

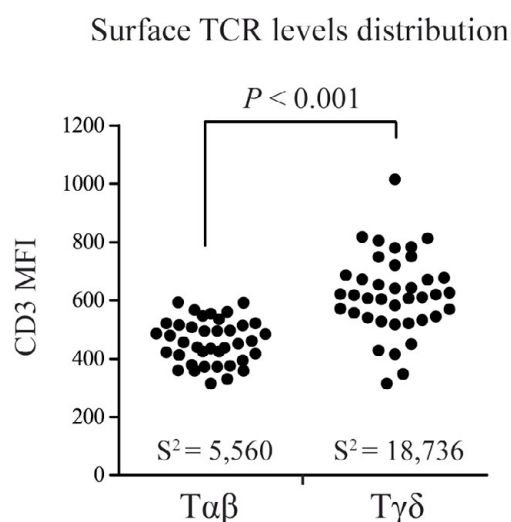


Figure D2.2: Heterogeneous surface TCR levels in $\gamma\delta$ vs $\alpha\beta$ T cells. Anti-CD3 mAb (SK7) geoMFI is represented within gated $\alpha\beta$ (IP26 $^+$) or $\gamma\delta$ (IMMU510 $^+$) T cells from 39 different healthy donors. In addition to the reported higher surface TCR geoMFI in $\gamma\delta$ T cells, variance (S^2) homogeneity was compared by the Snedecor F distribution test with 38 and 38 degrees of freedom.

T $\alpha\beta$, pero sin embargo no parece tener ningún efecto sobre la selección de los linfocitos T $\gamma\delta$. Se sabe que las células $\gamma\delta$ necesitan expresar al menos cierta cantidad de TCR en su membrana para poder seleccionarse, ya que en las deficiencias completas de CD3 ϵ y CD3 δ , donde no es posible la expresión del TCR, el desarrollo T $\gamma\delta$ está bloqueado (106).

El estudio del desarrollo T junto con el análisis de expresión del TCR discutido en el punto anterior

parecen indicar que para la selección $\gamma\delta$ es suficiente con un 10% de expresión con respecto a las condiciones normales y que sin embargo para la selección $\alpha\beta$ es necesaria mayor expresión del TCR. Con estos datos, proponemos el modelo presentado en la figura D2.3, que compara los diferentes requerimientos para la selección de los linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en base al nivel de expresión del TCR, en individuos normales y en la deficiencia parcial de CD3 δ . La selección de los linfocitos T en el timo

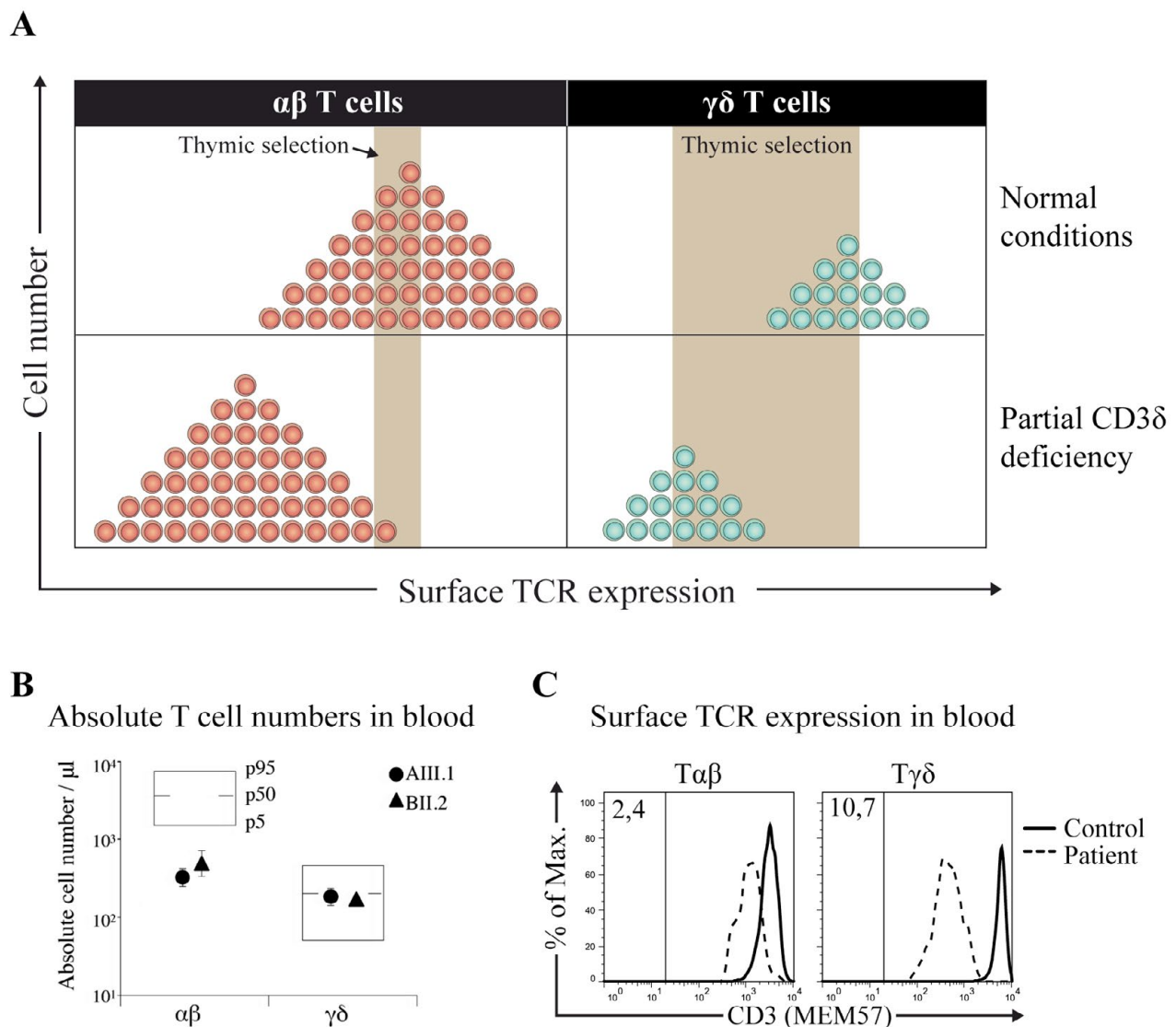


Figure D2.3: Model for thymic selection in partial CD3 δ deficiency. **A:** Proposed thymic selection model on the basis of surface TCR expression for $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ T cells in normal individuals and in patients with partial CD3 δ deficiency. **B:** Absolute T cell numbers in the 2 patients. **C:** Surface TCR expression in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells.

depende de la afinidad y/o avidez de la unión TCR-pMHC (16); de hecho, si se modifican los niveles de expresión de pMHC en la superficie de las células APC o los niveles de TCR en la superficie de las células T en desarrollo, como es nuestro caso, el resultado de la selección tímica se verá alterado (137, 138).

En el modelo que proponemos, la selección $\alpha\beta$ sería más estricta que la selección $\gamma\delta$ en lo que a niveles de expresión del TCR se refiere, y por tanto explicaría porque los pacientes padecen linfopenia $\alpha\beta$ pero no $\gamma\delta$. Sólo aquellos linfocitos $T\alpha\beta$ capaces de expresar altos niveles de TCR en su membrana, pese a la deficiencia parcial de CD3 δ , serían capaces de superar la selección tímica; presumiblemente este porcentaje de células ha de ser muy bajo, lo que concuerda con la linfopenia (fig. R2.1), la oligoclonalidad (fig. R2.2) y el fenotipo de memoria (118) observado en los linfocitos $T\alpha\beta$ de estos pacientes. Sin embargo, para los linfocitos $T\gamma\delta$ este requerimiento en los niveles de expresión del TCR en membrana para su selección sería más relajado, de modo que se seleccionarían números normales de linfocitos $T\gamma\delta$ (fig. R2.1), que además serían policlonales (fig. R2.2).

Además, esta diferencia en los requerimientos para la selección tímica de los dos linajes también explicaría lo discutido en el apartado anterior, por qué en periferia se observa un defecto de expresión mayor del TCR $\gamma\delta$, la variabilidad observada en la expresión del TCR $\gamma\delta$ en individuos sanos y lo observado en otras deficiencias parciales de CD3 δ o CD3 γ . Según esta hipótesis, en los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ , el defecto de expresión del TCR en los dos linajes sería el mismo antes de someterse a la selección tímica y las diferencias que observamos en periferia se deberían por tanto al efecto diferencial de la selección $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$.

Sin embargo este modelo sólo es aplicable a la selección tímica humana, ya que en ratones, cuando se reducen los niveles de expresión del TCR

(doble haploinsuficiencia de CD3 γ y CD3 δ), el efecto sobre la expresión del TCR es el mismo, el TCR $\gamma\delta$ se ve más afectado que el $\alpha\beta$, pero el efecto sobre los números absolutos de células es el contrario, los números de linfocitos $T\alpha\beta$ no se ven afectados y sin embargo existe una reducción en el número de linfocitos $T\gamma\delta$ (M. Muñoz-Ruiz, comunicación personal).

2.3. REDUCCIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN VÍA TCR $\alpha\beta$ PERO NO VÍA TCR $\gamma\delta$

El análisis de la señalización a través del TCR mostró que existía un defecto en la inducción de eventos tempranos (como CD69 y CD25) en linfocitos $T\alpha\beta$ primarios. Un análisis más exhaustivo en células cultivadas mostró que este defecto se mantenía, tanto en respuesta a células alogénicas como a anti-CD3. Sin embargo los linfocitos $T\gamma\delta$ cultivados, pese a mostrar un mayor defecto de expresión del TCR, inducían CD69 en la misma medida que las células control (fig. R2.5). Esta capacidad de los linfocitos $T\gamma\delta$ de señalizar como las células control, pese a expresar 10 veces menos TCR, es sorprendente, y quizás esté contribuyendo a la selección de estas células en el timo, a diferencia de los linfocitos $T\alpha\beta$, que pese a tener un menor defecto de expresión muestran una capacidad de señalización mucho menor.

Sorprendentemente, el análisis de eventos tardíos como la proliferación a 5 días en respuesta a anti-CD3 descrita en Gil *et al*, 2011 (figura suplemental 6D, anexo), mostró que la capacidad proliferativa en respuesta a señalización vía TCR era normal en ambos linajes (110).

También se analizó la capacidad de internalizar y posteriormente reexpresar el TCR en los linfocitos T de los pacientes. La internalización mediada por anticuerpos anti-CD3 fue normal tanto en linfocitos T $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$, sin embargo, la re-expresión del TCR, en linfocitos $T\alpha\beta$, mostró un ligero retraso en comparación con las células control. Estos datos sugieren que los TCR que se expresan en la membrana de los linfocitos $T\alpha\beta$ de estos pacientes siguen una cinética de activación y posterior internalización normal y

por tanto, lo más probable es que los defectos de activación observados en la inducción de eventos como CD69 y CD25 se deban tan solo a los menores niveles de expresión del TCR. Sin embargo, se observa un defecto, aunque leve, en la re-expresión del TCR tras los procesos de internalización. Como ya se comentó en la introducción, la re-expresión del TCR depende de procesos de reciclaje y síntesis *de novo*; presumiblemente la deficiencia parcial de CD3 δ ralentice la síntesis *de novo* del TCR ya que la disponibilidad de uno de sus componentes está disminuida (fig. R2.6).

2.4. EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$ CD4⁺ EN LA DEFICIENCIA PARCIAL DE CD3 δ

Existen tres tipos de linfocitos T $\gamma\delta$ según la expresión de los correceptores CD4 y CD8, los DN, los CD8⁺ y los CD4⁺, los factores que regulan la selección en el timo u homeostasis de estas subpoblaciones no se conocen con exactitud. En individuos sanos los linfocitos T $\gamma\delta$ DN son mayoritarios, mientras que los CD4⁺ son muy escasos (<1%), sin embargo, y pese a su baja frecuencia en sangre, estas células se han conservado a lo largo de la evolución (21). Además se han descrito linfomas causados por expansiones de células $\gamma\delta$ CD4⁺ (139, 140), se han aislado clones tanto de hígado fetal (141, 142) como de sangre periférica (122, 143, 144) y también se han descrito expansiones locales en pacientes con asma bronquial, donde se ha propuesto que correlacionan con el fenotipo de tipo Th2 que muestran estos pacientes (145).

Los dos pacientes descritos en esta tesis presentaban un inusual aumento de la subpoblación T $\gamma\delta$ CD4⁺, y aunque el resto de subpoblaciones $\gamma\delta$ no se veían afectadas en número de células, sí en porcentaje debido al aumento de las CD4⁺ (fig. R2.7). Creemos que estos pacientes constituyen el primer caso, en humanos, que indica que el desarrollo de los linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺ podría estar regulado por la expresión y/o función del TCR.

Se realizaron varios ensayos con el fin de determinar la causa del aumento en el número de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺. El estudio de la expresión de marcadores de regiones variables del TCR (V δ 1, V δ 2 y V γ 9)

mostró una diversidad normal tanto de las células $\gamma\delta$ CD4⁺ como de las CD4⁻, descartando así que su origen fuesen expansiones clonales (fig. R2.8). Su aumento tampoco parecía ser consecuencia de la linfopenia T $\alpha\beta$, ya que pacientes con linfopenia $\alpha\beta$, como los deficientes en TCR α , no mostraban esta expansión (115). También descartamos que su expansión se debiese a diferencias cuantitativas en la expresión del TCR de las células $\gamma\delta$ CD4⁺ frente a las CD4⁻, ya que las dos subpoblaciones mostraban niveles similares de expresión (fig. R2.10).

Más bien parece que el aumento en el número de células $\gamma\delta$ CD4⁺ se debe a la disminución en los niveles de expresión del TCR del conjunto de las células $\gamma\delta$. Siguiendo la hipótesis planteada en el punto anterior (fig. D2.3), nuestros resultados son consistentes con un escenario en el que en condiciones normales, las células $\gamma\delta$ CD4⁺ serían diana de la selección negativa. Sin embargo, en la deficiencia parcial de CD3 δ y debido al defecto de expresión del TCR, se debilitarían las señales enviadas a través del TCR, impidiendo así su selección negativa y por tanto favoreciendo su desarrollo, que en último término llevaría a la expansión de las células $\gamma\delta$ CD4⁺ que observamos en estos pacientes.

Siguiendo este argumento analizamos otras inmunodeficiencias con bajos niveles de expresión del TCR (deficiencia completa de CD3 γ y de ζ) y sin embargo no observamos la presencia de células $\gamma\delta$ CD4⁺ en estos pacientes (fig. R2.9). Bien es cierto que en estas deficiencias no sólo están afectados los niveles de expresión del TCR, además existen alteraciones en la estequiometría que no se producen en los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ . Sería muy interesante poder analizar la presencia de células $\gamma\delta$ CD4⁺ en el único individuo descrito con deficiencia parcial de CD3 ϵ (111), ya que sus células presentan un defecto de expresión del TCR similar al de los pacientes descritos en esta tesis, y como en nuestro caso, no se esperan cambios en la estequiometría del TCR.

Se han descrito varios modelos murinos que presentan expansiones de linfocitos T $\gamma\delta$ CD4⁺, por

ejemplo ratones KO para Tec quinasa (Itk) (146-148), para el factor de transcripción KLF2 (149) y ratones con mutaciones en LAT (150). Estos ratones tienen en común con los dos pacientes descritos en esta tesis la linfopenia $T\alpha\beta$ y los números normales o elevados de linfocitos $T\gamma\delta$. Además, en estos 3 modelos se ha descrito una sobreexpresión de citoquinas Th2 que provoca un aumento en los niveles de IgE en plasma. Del mismo modo, el paciente A mostró altos niveles de IgE y eosinofilia, mientras que los niveles de IgE no se pudieron determinar en el paciente B debido a su enteropatía con pérdida de proteínas e hipogammaglobulinemia severa (110). Es decir, que parece que la expresión de CD4 por parte de las células $\gamma\delta$, al igual que para las células $\alpha\beta$, correlaciona con actividad tipo Th2. De hecho, se ha descrito esta correlación entre expresión de CD4 y fenotipo Th2 en clones $T\gamma\delta$ CD4⁺ tanto humanos (122) como murinos (151). De este modo podemos aventurarnos a pensar que quizás la expansión de linfocitos $T\gamma\delta$ CD4⁺ en los pacientes con deficiencia parcial de CD3 δ estuviese contribuyendo al fenotipo Th2 observado en el paciente A.

La caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos $T\gamma\delta$ CD4⁺ mostró que estos linfocitos exhibían un fenotipo preactivado (para las moléculas CD69 y CD25) tanto *ex vivo* como en cultivo en comparación con los CD4⁻ (fig. R2.11). Este fenotipo preactivado, para la expresión de CD69, también se ha observado en los ratones mutantes de LAT (150). En este mismo sentido, en ratones KO para Itk se describió que los linfocitos $T\gamma\delta$ CD4⁺ mostraban un fenotipo efector (CD44^{high}/CD-62L^{low}) (147). Por tanto, parece que tanto en humanos como en ratón, los linfocitos $T\gamma\delta$ CD4⁺ están intrínsecamente activados, lo que podría tener cierta relevancia en la patología de los pacientes.

En conclusión, nuestros datos sugieren que las poblaciones $\gamma\delta$ DN, CD8⁺ y CD4⁺ son linajes con diferentes requerimientos para su desarrollo y selección y que la expresión y función del TCR es crítico para el desarrollo de la subpoblación $T\gamma\delta$ CD4⁺. Además, estos resultados son de gran relevancia diagnóstica,

ya que la deficiencia parcial de CD3 δ es hasta la fecha la única inmunodeficiencia primaria en la que se ha descrito un aumento en esta subpoblación. Por tanto, en pacientes con inmunodeficiencia primaria y aumento en el número de linfocitos $T\gamma\delta$ CD4⁺, se deberían estudiar posibles mutaciones en *CD3D*.

10 /

Conclusions

10 / Conclusions

1. INDUCED CD3 γ OR CD3 δ DEFICIENCY IN HUMAN MATURE $\alpha\beta$ T CELLS

- 1.1. Stable CD3 γ and CD3 δ KD Jurkat cell lines were generated and characterized.
- 1.2. Both CD3 γ and CD3 δ were shown to be required for TCR association to ζ , egress from the ER into the Golgi for proper glycosylation and surface expression. Thus, in these KD T cells:
 - a) TCR $\alpha\beta$ signalling could not be studied, and
 - b) Surface TCR isoforms lacking CD3 γ (or CD3 δ) were not observed, in contrast to our previous findings in primary T cells from congenital CD3 γ deficiencies.
- 1.3. Both TCR α -CD3 $\delta\epsilon$ and TCR β -CD3 $\gamma\epsilon$ interactions were shown to be possible as a first step for TCR assembly, not only the former as described in B cell microsomes.
- 1.4. TCR α was likely more promiscuous than TCR β , as it was found to bind not only CD3 $\delta\epsilon$ but also CD3 $\gamma\epsilon$ dimers.

2. PARTIAL HUMAN CONGENITAL CD3 δ DEFICIENCY

- 2.1. Congenital CD3 δ deficiency caused a stronger (10-fold) impact in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ (2-fold) TCR surface expression, whereas CD3 δ KD had a similar impact on surface TCR expression by $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ primary T cells.
 - 2.2. Unexpectedly, signaling was shown to be impaired via the $\alpha\beta$, but not the $\gamma\delta$, TCR.
 - 2.3. Peripheral blood $\gamma\delta$ T cell numbers were normal whereas $\alpha\beta$ T cells were strongly reduced, suggesting that human $\gamma\delta$ T cells are less dependent on TCR expression than $\alpha\beta$ T cells for development in the thymus.
 - 2.4. A unique abnormal expansion of activated polyclonal CD4⁺ $\gamma\delta$ T cells was ascertained, which could be of diagnostic interest for patients with T $\alpha\beta$ ⁻T $\gamma\delta$ ⁺ phenotype.
-

Together, our results show that post-thymic mature T cells made CD3 γ - or CD3 δ -deficient by KD did not recapitulate the corresponding congenital CD3 deficiencies in terms of surface TCR expression, suggesting that intrathymic pressures allow for plasticity of emerging lymphocytes with disparate surface TCR levels, both high (as in CD3 γ -deficient T cells) and low (as in CD3 δ -deficient $\gamma\delta$ T cells).

11 /

Perspectivas

11 /

Perspectivas

Durante la redacción de la tesis han surgido ideas de experimentos que podrían ayudar a entender el funcionamiento del TCR. Quedan listados a continuación.

1. DEFICIENCIA INDUCIDA (KNOCK DOWN) DE CD3 γ O CD3 δ

1.1. Co-immunoprecipitaciones de TCR α y CD3 con anti-TCR α (experimento análogo al mostrado en la figura R1.10) para corroborar los resultados obtenidos precipitando con anticuerpos anti-TCR β . Los anti-TCR α probados (α F1, H-142, ab18861) no han servido a este propósito.

1.2. Análisis mediante co-IP de la posible unión de chaperonas a los complejos parciales o con estequiometría aberrante ensamblados en las líneas KD.

1.3. Utilizar la línea Jurkat shCD3 δ como modelo para el estudio de las funciones de esta cadena. Disponemos de construcciones quiméricas con las regiones EC, TM e IC de CD3 γ y CD3 δ que se podrían introducir en esta línea para determinar qué porciones de CD3 γ pueden sustituir las de CD3 δ . También se podrían utilizar construcciones con distintas mutaciones en la cadena CD3 δ para valorar su impacto en el ensamblaje y expresión del TCR.

1.4. En colaboración con el laboratorio de Balbino Alarcón, transfectar nuestras líneas KD con su construcción de CD3 ϵ que tiene mutada la señal de retención en el RE presente en esta cadena, y valorar si es posible la expresión en superficie de TCR carentes de CD3 γ o CD3 δ cuando esta secuencia no está presente.

2. DEFICIENCIA CONGÉNITA PARCIAL DE CD3 δ

Hemos establecido una colaboración con el laboratorio de M.L. Toribio (CBMSO) para estudiar el papel de CD3 δ en la selección tímica. Los objetivos son: comprobar que la expansión de las células T $\gamma\delta$ CD4 $^{+}$ se debe a la deficiencia parcial de CD3 δ ; y probar nuestra hipótesis sobre la distinta dependencia en los niveles de expresión del TCR para la selección de los linfocitos T $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$. Para ello, se silenciará la expresión de CD3 δ , utilizando el shRNA descrito en el primer bloque de resultados, en precursores tímicos humanos derivados de niños timectomizados por razones quirúrgicas. Estos precursores se diferenciarán ex vivo en lóbulos de timo fetal de origen múrido (FTOC) o in vivo en ratones SCID. Posteriormente se analizará por citometría de flujo el efecto del KD de CD3 δ sobre el desarrollo T.

Bibliografía

12 /

Bibliografía

1. Litman, G.W., Rast, J.P., and Fugmann, S.D. 2010. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 10:543-553.
2. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. 2007. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: Elsevier.
3. Kalyan, S., and Kabelitz, D. 2013. Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol* 10:21-29.
4. Correia, D.V., Lopes, A., and Silva-Santos, B. 2013. Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncol Immunology* 2:1, 1-5.
5. Casetti, R., and Martino, A. 2008. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 5:161-170.
6. Chen, Z.W. 2013. Multifunctional immune responses of HMBPP-specific Vgamma2Vdelta2 T cells in M. tuberculosis and other infections. *Cell Mol Immunol* 10:58-64.
7. Hayday, A.C. 2009. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 31:184-196.
8. Vantourout, P., and Hayday, A. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of [gamma][delta] T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13:88-100.
9. Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
10. Kang, J., and Raulet, D.H. 1997. Events that regulate differentiation of alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells from a common precursor. *Semin Immunol* 9:171-179.
11. Livak, F., Wilson, A., MacDonald, H.R., and Schatz, D.G. 1997. Alpha beta lineage-committed thymocytes can be rescued by the gamma delta T cell receptor (TCR) in the absence of TCR beta chain. *Eur J Immunol* 27:2948-2958.
12. Hayes, S.M., Li, L., and Love, P.E. 2005. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* 22:583-593.
13. Taghon, T., and Rothenberg, E.V. 2008. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alphabeta and TCR-gammadelta T cell development. *Semin Immunopathol* 30:383-398.
14. Ciofani, M., and Zuniga-Pflucker, J.C. 2010. Determining gammadelta versus alphabeta T cell development. *Nat Rev Immunol* 10:657-663.
15. Lee, S.Y., Stadanlick, J., Kappes, D.J., and Wiest, D.L. 2010. Towards a molecular understanding of the differential signals regulating alphabeta/gammadelta T lineage choice. *Semin Immunol* 22:237-246.
16. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9:833-844.
17. Carpenter, A.C., and Bosselut, R. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11:666-673.
18. Gascoigne, N.R., and Palmer, E. 2011. Signaling in thymic selection. *Curr Opin Immunol* 23:207-212.

19. Xion, N.R., D. H. 2007. Development and selection of gd T cells. *Immunological Reviews* 215:15-31.
20. Dent, A.L., Matis, L.A., Hooshmand, F., Widacki, S.M., Bluestone, J.A., and Hedrick, S.M. 1990. Self-reactive gamma delta T cells are eliminated in the thymus. *Nature* 343:714-719.
21. Hayday, A.C. 2000. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18:975-1026.
22. Jensen, K.D., and Chien, Y.H. 2009. Thymic maturation determines gammadelta T cell function, but not their antigen specificities. *Curr Opin Immunol* 21:140-145.
23. Ashwell, J.D., and Klausner, R.D. 1990. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 8:139-167.
24. Call, M.E., Pyrdol, J., and Wucherpfennig, K.W. 2004. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 23:2348-2357.
25. Weiss, A. 1990. Structure and function of the T cell antigen receptor. *J Clin Invest* 86:1015-1022.
26. Kane, L.P., Lin, J., and Weiss, A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* 12:242-249.
27. Tunnacliffe, A., Buluwela, L., and Rabbitts, T.H. 1987. Physical linkage of three CD3 genes on human chromosome 11. *EMBO J* 6:2953-2957.
28. Weissman, A.M., Samelson, L.E., and Klausner, R.D. 1986. A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature* 324:480-482.
29. Wucherpfennig, K.W., Gagnon, E., Call, M.J., Huseby, E.S., and Call, M.E. 2010. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a005140.
30. Manolios, N., Letourneur, F., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. 1991. Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *EMBO J* 10:1643-1651.
31. Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., Wucherpfennig, K.W., and 2002. The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex. *Cell* 111:967-979.
32. Exley, M., Wileman, T., Mueller, B., and Terhorst, C. 1995. Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. *Mol Immunol* 32:829-839.
33. Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E., and de la Hera, A. 1999. Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1547-1552.
34. Feito, M.J., Jimenez-Perianez, A., Ojeda, G., Sanchez, A., Portoles, P., and Rojo, J.M. 2002. The TCR/CD3 complex: molecular interactions in a changing structure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50:263-272.
35. Punt, J.A., Roberts, J.L., Kears, K.P., and Singer, A. 1994. Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains. *J Exp Med* 180:587-593.
36. James, J.R., McColl, J., Oliveira, M.I., Dunne, P.D., Huang, E., Jansson, A., Nilsson, P., Sleep, D.L., Goncalves, C.M., Morgan, S.H., et al. 2011. The T cell receptor triggering apparatus is composed of monovalent or monomeric proteins. *J Biol Chem* 286:31993-32001.
37. Blumberg, R.S., Ley, S., Sancho, J., Lonberg, N., Lacy, E., McDermott, F., Schad, V., Greenstein, J.L., and Terhorst, C. 1990. Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7220-7224.
38. Alarcon, B., Ley, S.C., Sanchez-Madrid, F., Blumberg, R.S., Ju, S.T., Fresno, M., and Terhorst, C. 1991. The CD3-gamma and CD3-delta subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *EMBO J* 10:903-912.

39. Siegers, G.M., Swamy, M., Fernandez-Malave, E., Minguet, S., Rathmann, S., Guardo, A.C., Perez-Flores, V., Regueiro, J.R., Alarcon, B., Fisch, P., et al. 2007. Different composition of the human and the mouse gammadelta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. In *J Exp Med*. United States. 2537-2544.
40. Zapata, D.A., Schamel, W.W., Torres, P.S., Alarcon, B., Rossi, N.E., Navarro, M.N., Toribio, M.L., and Regueiro, J.R. 2004. Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor.CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J Biol Chem* 279:24485-24492.
41. Kappes, D.J., and Tonegawa, S. 1991. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10619-10623.
42. Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., Vignali, K.M., Dilioglou, S., Vanin, E.F., and Vignali, D.A. 2004. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22:589-594.
43. Kearse, K.P., Roberts, J.L., and Singer, A. 1995. TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+ CD8+ thymocytes. *Immunity* 2:391-399.
44. Brenner, M.B., Trowbridge, I.S., and Strominger, J.L. 1985. Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40:183-190.
45. Call, M.E., and Wucherpfennig, K.W. 2004. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol* 40:1295-1305.
46. Xu, C., Call, M.E., and Wucherpfennig, K.W. 2006. A membrane-proximal tetracysteine motif contributes to assembly of CD3deltaepsilon and CD3gammaepsilon dimers with the T cell receptor. *J Biol Chem* 281:36977-36984.
47. Hayes, S.M., Shores, E.W., and Love, P.E. 2003. An architectural perspective on signaling by the pre-, alphabeta and gammadelta T cell receptors. *Immunol Rev* 191:28-37.
48. Call, M.E., and Wucherpfennig, K.W. 2005. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* 23:101-125.
49. Vincent, M.S., Gumperz, J.E., and Brenner, M.B. 2003. Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat Immunol* 4:517-523.
50. Born, W.K., Kemal Aydinoglu, M., and O'Brien, R.L. 2013. Diversity of gammadelta T-cell antigens. *Cell Mol Immunol* 10:13-20.
51. Kuhns, M.S., and Davis, M.M. 2007. Disruption of extracellular interactions impairs T cell receptor-CD3 complex stability and signaling. *Immunity* 26:357-369.
52. Wegener, A.M., Hou, X., Dietrich, J., and Geisler, C. 1995. Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 270:4675-4680.
53. Kearse, K.P., Williams, D.B., and Singer, A. 1994. Persistence of glucose residues on core oligosaccharides prevents association of TCR alpha and TCR beta proteins with calnexin and results specifically in accelerated degradation of nascent TCR alpha proteins within the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13:3678-3686.
54. Ellgaard, L., and Helenius, A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181-191.
55. Ruddock, L.W., and Molinari, M. 2006. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 119:4373-4380.
56. Lowe, J.B. 2001. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell* 104:809-812.
57. Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. 2009. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor NY.

58. Dietrich, J., Kastrup, J., Lauritsen, J.P., Menne, C., von Bulow, F., and Geisler, C. 1999. TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur J Immunol* 29:1719-1728.
59. Rajagopalan, S., Xu, Y., and Brenner, M.B. 1994. Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* 263:387-390.
60. van Leeuwen, J.E., and Kearse, K.P. 1996. Calnexin associates exclusively with individual CD3 delta and T cell antigen receptor (TCR) alpha proteins containing incompletely trimmed glycans that are not assembled into multisubunit TCR complexes. *J Biol Chem* 271:9660-9665.
61. Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W., and Aoe, T. 2001. The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 20:3082-3091.
62. Lee, S.J. 1998. Endoplasmic reticulum retention and degradation of T cell antigen receptor beta chain. *Exp Mol Med* 30:159-164.
63. Wileman, T., Kane, L.P., Young, J., Carson, G.R., and Terhorst, C. 1993. Associations between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER. *J Cell Biol* 122:67-78.
64. Letourneur, F., and Klausner, R.D. 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
65. Mallabiabarrena, A., Jimenez, M.A., Rico, M., and Alarcon, B. 1995. A tyrosine-containing motif mediates ER retention of CD3-epsilon and adopts a helix-turn structure. *EMBO J* 14:2257-2268.
66. Delgado, P., and Alarcon, B. 2005. An orderly inactivation of intracellular retention signals controls surface expression of the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 201:555-566.
67. Klausner, R.D., Lippincott-Schwartz, J., and Bonifacino, J.S. 1990. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol* 6:403-431.
68. Sussman, J.J., Bonifacino, J.S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M., Saito, T., Klausner, R.D., and Ashwell, J.D. 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52:85-95.
69. Minami, Y., Weissman, A.M., Samelson, L.E., and Klausner, R.D. 1987. Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2688-2692.
70. Geisler, C. 2004. TCR trafficking in resting and stimulated T cells. *Crit Rev Immunol* 24:67-86.
71. Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A.M., Pedersen, L.O., Odum, N., and Geisler, C. 1996. Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. *J Biol Chem* 271:11441-11448.
72. Torres, P.S., Zapata, D.A., Pacheco-Castro, A., Rodriguez-Fernandez, J.L., Cabanas, C., and Regueiro, J.R. 2002. Contribution of CD3 gamma to TCR regulation and signaling in human mature T lymphocytes. *Int Immunol* 14:1357-1367.
73. Torres, P.S., Alcover, A., Zapata, D.A., Arnaud, J., Pacheco, A., Martin-Fernandez, J.M., Villasevil, E.M., Sanal, O., and Regueiro, J.R. 2003. TCR dynamics in human mature T lymphocytes lacking CD3 gamma. *J Immunol* 170:5947-5955.
74. D'Oro, U., Munitic, I., Chacko, G., Karpova, T., McNally, J., and Ashwell, J.D. 2002. Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain. *J Immunol* 169:6269-6278.
75. Martin, S., and Bevan, M.J. 1998. Transient alteration of T cell fine specificity by a strong primary stimulus correlates with T cell receptor down-regulation. *Eur J Immunol* 28:2991-3002.
76. Naramura, M., Jang, I.K., Kole, H., Huang, F., Haines, D., and Gu, H. 2002. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3:1192-1199.

77. Niedergang, F., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. 1997. Peptide antigen or superantigen-induced down-regulation of TCRs involves both stimulated and unstimulated receptors. *J Immunol* 159:1703-1710.
78. Gobel, T.W., and Dangy, J.P. 2000. Evidence for a stepwise evolution of the CD3 family. *J Immunol* 164:879-883.
79. Gouaillard, C., Huchenq-Champagne, A., Arnaud, J., Chen Cl, C.L., and Rubin, B. 2001. Evolution of T cell receptor (TCR) alpha beta heterodimer assembly with the CD3 complex. *Eur J Immunol* 31:3798-3805.
80. Perez-Aciego, P., Alarcon, B., Arnaiz-Villena, A., Terhorst, C., Timon, M., Segurado, O.G., and Regueiro, J.R. 1991. Expression and Function of a Variant T Cell Receptor Complex Lacking CD3g *J Exp Med* 174:319-326.
81. Arnaiz-Villena, A., Timon, M., Corell, A., Perez-Aciego, P., Martin-Villa, J.M., and Regueiro, J.R. 1992. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 327:529-533.
82. Pacheco-Castro, A., Alvarez-Zapata, D., Serrano-Torres, P., and Regueiro, J.R. 1998. Signaling through a CD3 gamma-deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 161:3152-3160.
83. Zapata, D.A., Pacheco-Castro, A., Torres, P.S., Ramiro, A.R., San Jose, E., Alarcon, B., Alibaud, L., Rubin, B., Toribio, M.L., and Regueiro, J.R. 1999. Conformational and biochemical differences in the TCR.CD3 complex of CD8(+) versus CD4(+) mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma. *J Biol Chem* 274:35119-35128.
84. Buferne, M., Luton, F., Letourneur, F., Hoeveler, A., Couez, D., Barad, M., Malissen, B., Schmitt-Verhulst, A.M., and Boyer, C. 1992. Role of CD3 delta in surface expression of the TCR/CD3 complex and in activation for killing analyzed with a CD3 delta-negative cytotoxic T lymphocyte variant. *J Immunol* 148:657-664.
85. Luton, F., Buferne, M., Legendre, V., Chauvet, E., Boyer, C., and Schmitt-Verhulst, A.M. 1997. Role of CD3gamma and CD3delta cytoplasmic domains in cytolytic T lymphocyte functions and TCR/CD3 down-modulation. *J Immunol* 158:4162-4170.
86. Geisler, C. 1992. Failure to synthesize the CD3-gamma chain. Consequences for T cell antigen receptor assembly, processing, and expression. *J Immunol* 148:2437-2445.
87. Kuhns, M.S., Davis, M.M., and Garcia, K.C. 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24:133-139.
88. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27:591-619.
89. Kuhns, M.S., and Davis, M.M. 2012. TCR Signaling Emerges from the Sum of Many Parts. *Front Immunol* 3:159.
90. Kim, S.T., Takeuchi, K., Sun, Z.Y., Touma, M., Castro, C.E., Fahmy, A., Lang, M.J., Wagner, G., and Reinherz, E.L. 2009. The alphabeta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *J Biol Chem* 284:31028-31037.
91. Xu, C., Gagnon, E., Call, M.E., Schnell, J.R., Schwieters, C.D., Carman, C.V., Chou, J.J., and Wucherpennig, K.W. 2008. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* 135:702-713.
92. Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109:901-912.
93. Borroto, A., Arellano, I., Blanco, R., Fuentes, M., Orfao, A., Dopfer, E.P., Prouza, M., Suchanek, M., Schamel, W.W., and Alarcon, B. 2014. Relevance of Nck-CD3{varepsilon} Interaction for T Cell Activation In Vivo. *J Immunol*.

-
94. Schamel, W.W., Arechaga, I., Risueno, R.M., van Santen, H.M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J.M., and Alarcon, B. 2005. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med* 202:493-503.
 95. Alarcon, B., Swamy, M., van Santen, H.M., and Schamel, W.W. 2006. T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. *EMBO Rep* 7:490-495.
 96. Minguet, S., and Schamel, W.W. 2008. A permissive geometry model for TCR-CD3 activation. In *Trends Biochem Sci. England*. 51-57.
 97. Schamel, W.W., and Alarcon, B. 2013. Organization of the resting TCR in nanoscale oligomers. *Immunol Rev* 251:13-20.
 98. Kumar, R., Ferez, M., Swamy, M., Arechaga, I., Rejas, M.T., Valpuesta, J.M., Schamel, W.W., Alarcon, B., and van Santen, H.M. 2011. Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment of oligomeric T cell receptor complexes. *Immunity* 35:375-387.
 99. Brownlie, R.J., and Zamoyska, R. 2013. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13:257-269.
 100. Regueiro, J.R., Arnaiz-Villena, A., Ortiz de Landazuri, M., Martin Villa, J.M., Vicario, J.L., Pascual-Ruiz, V., Guerra-Garcia, F., Alcami, J., Lopez-Botet, M., and Manzanares, J. 1986. Familial defect of CD3 (T3) expression by T cells associated with rare gut epithelial cell autoantibodies. *Lancet* 1:1274-1275.
 101. Sanal, O., Yel, L., Ersoy, F., Tezcan, I., and Berkel, A.I. 1996. Low expression of T-cell receptor-CD3 complex: a case with a clinical presentation resembling humoral immunodeficiency. *Turk J Pediatr* 38:81-84.
 102. Allende, L.M., Garcia-Perez, M.A., Moreno, A., Ruiz-Contreras, J., and Arnaiz-Villena, A. 2000. Fourteen years' follow-up of an autoimmune patient lacking the CD3 gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *Blood* 96:4007-4008.
 103. Recio, M.J., Moreno-Pelayo, M.A., Kilic, S.S., Guardo, A.C., Sanal, O., Allende, L.M., Perez-Flores, V., Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Seoane, E., et al. 2007. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. In *J Immunol. United States*. 2556-2564.
 104. Ozgur, T.T., Asal, G.T., Cetinkaya, D., Orhan, D., Kilic, S.S., Usta, Y., Ozen, H., and Tezcan, I. 2008. Hematopoietic stem cell transplantation in a CD3 gamma-deficient infant with inflammatory bowel disease. *Pediatr Transplant* 12:910-913.
 105. Tokgoz, H., Caliskan, U., Keles, S., Reisli, I., Guju, I.S., and Morgan, N.V. 2013. Variable presentation of primary immune deficiency: two cases with CD3 gamma deficiency presenting with only autoimmunity. *Pediatr Allergy Immunol* 24:257-262.
 106. Dadi, H., Simon, A.J., and Roifman, C.M. 2003. Effect of CD3d deficiency on maturation of ab and gd T-cell lineages in Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med* 349:1821-1828.
 107. de Saint Basile, G., Geissmann, F., Flori, E., Uring-Lambert, B., Soudais, C., Cavazzana-Calvo, M., Durandy, A., Jabado, N., Fischer, A., and Le Deist, F. 2004. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest* 114:1512-1517.
 108. Takada, H., Nomura, A., Roifman, C.M., and Hara, T. 2005. Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene. *Eur J Pediatr* 164:311-314.
 109. Marcus, N., Takada, H., Law, J., Cowan, M.J., Gil, J., Regueiro, J.R., Plaza Lopez de Sabando, D., Lopez-Granados, E., Dalal, J., Friedrich, W., et al. 2011. Hematopoietic stem cell transplantation for CD3delta deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 128:1050-1057.
 110. Gil, J., Busto, E.M., Garcillan, B., Chean, C., Garcia-Rodriguez, M.C., Diaz-Alderete, A., Navarro, J., Reine, J., Mencia, A., Gurbindo, D., et al. 2011. A leaky mutation in CD3D differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ +B+ NK^+ human SCID. *J Clin Invest* 121:3872-3876.
-

111. Soudais, C., de Villartay, J.P., Le Deist, F., Fischer, A., and Lisowska-Grospierre, B. 1993. Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat Genet* 3:77-81.
112. Rieux-Laucat, F., Hivroz, C., Lim, A., Mateo, V., Pellier, I., Selz, F., Fischer, A., and Le Deist, F. 2006. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N Engl J Med* 354:1913-1921.
113. Roberts, J.L., Lauritsen, J.P., Cooney, M., Parrott, R.E., Sajaroff, E.O., Win, C.M., Keller, M.D., Carpenter, J.H., Carabana, J., Krangel, M.S., et al. 2007. T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood* 109:3198-3206.
114. Marín, A.V.M., Mazariegos, M.S., Jiménez-Reinoso, A., Munoz-Ruiz, M., Aydogmus, C.Y., Hocaoglu, A., Cipe, F., Regueiro, J.R., and Garcillan, B. 2014. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in the zeta subunit of the TCR. (in preparation).
115. Morgan, N.V., Goddard, S., Cardno, T.S., McDonald, D., Rahman, F., Barge, D., Ciupek, A., Straatman-Iwanowska, A., Pasha, S., Guckian, M., et al. 2011. Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalphabeta+ T cells. *J Clin Invest* 121:695-702.
116. Mazariegos, M.S., Munoz-Ruiz, M., Reiné, J., Garcillán, B., Recio, M.J., Fernández-Malavé, E., and Regueiro, J.R. 2013. Inmunodeficiencias congénitas del receptor de antígeno de los linfocitos T. *Inmunología* 32:94-101.
117. Liston, A., Enders, A., and Siggs, O.M. 2008. Unravelling the association of partial T-cell immunodeficiency and immune dysregulation. *Nat Rev Immunol* 8:545-558.
118. Gil, J., Busto, E.M., Garcillan, B., Chean, C., Garcia-Rodriguez, M.C., Diaz-Alderete, A., Navarro, J., Reine, J., Mencia, A., Gurbindo, D., et al. 2011. A leaky mutation in CD3D differentially affects alphabeta and gammadelta T cells and leads to a Talphabeta-Tgammadelta+B+NK+ human SCID. *J Clin Invest* 121:3872-3876.
119. Hewitt, C.R., Lamb, J.R., Hayball, J., Hill, M., Owen, M.J., and O'Hehir, R.E. 1992. Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of Staphylococcus aureus enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 175:1493-1499.
120. Gavrillo, K., and Saltzman, W.M. 2012. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med* 85:187-200.
121. Ehl, S., Schwarz, K., Enders, A., Duffner, U., Pannicke, U., Kuhr, J., Mascart, F., Schmitt-Graeff, A., Niemeyer, C., and Fisch, P. 2005. A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest* 115:3140-3148.
122. Spits, H., Paliard, X., Vandekerckhove, Y., van Vlasselaer, P., and de Vries, J.E. 1991. Functional and phenotypic differences between CD4+ and CD4- T cell receptor-gamma delta clones from peripheral blood. *J Immunol* 147:1180-1188.
123. Kitchen, S.G., Korin, Y.D., Roth, M.D., Landay, A., and Zack, J.A. 1998. Costimulation of naive CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 72:9054-9060.
124. Bonifacio, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M., and Klausner, R.D. 1989. Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J Cell Biol* 109:73-83.
125. Dave, V.P., Keefe, R., Berger, M.A., Drbal, K., Punt, J.A., Wiest, D.L., Alarcon, B., and Kappes, D.J. 1998. Altered functional responsiveness of thymocyte subsets from CD3delta-deficient mice to TCR-CD3 engagement. *Int Immunol* 10:1481-1490.

126. Dietrich, J., Neisig, A., Hou, X., Wegener, A.M., Gajhede, M., and Geisler, C. 1996. Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *J Cell Biol* 132:299-310.
127. Lauritsen, J.P., Bonefeld, C.M., von Essen, M., Nielsen, M.W., Rasmussen, A.B., Odum, N., Dietrich, J., and Geisler, C. 2004. Masking of the CD3 gamma di-leucine-based motif by zeta is required for efficient T-cell receptor expression. *Traffic* 5:672-684.
128. Chen, C., Bonifacio, J.S., Yuan, L.C., and Klausner, R.D. 1988. Selective degradation of T cell antigen receptor chains retained in a pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 107:2149-2161.
129. Hall, C., Berkhout, B., Alarcon, B., Sancho, J., Wileman, T., and Terhorst, C. 1991. Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int Immunol* 3:359-368.
130. Pacheco-Castro, A., Martin-Fernandez, J.M., Millan, R., Sanal, O., Allende, L., and Regueiro, J.R. 2003. Toward gene therapy for human CD3 deficiencies. *Hum Gene Ther* 14:1653-1661.
131. Fernandez-Malave, E., Wang, N., Pulgar, M., Schamel, W.W., Alarcon, B., and Terhorst, C. 2006. Overlapping functions of human CD3delta and mouse CD3gamma in alphabeta T-cell development revealed in a humanized CD3gamma-mouse. *Blood* 108:3420-3427.
132. Garcillan, B., Mazariegos, M.S., Fisch, P., Res, P.C., Munoz-Ruiz, M., Gil, J., Lopez-Granados, E., Fernandez-Malave, E., and Regueiro, J.R. 2013. Enrichment of the rare CD4+ $\gamma\delta$ T-cell subset in patients with atypical CD3 δ deficiency. *J Allergy Clin Immunol* (Epub ahead of print 2013/12/03).
133. Morley, B.J., Chin, K.N., Newton, M.E., and Weiss, A. 1988. The lysine residue in the membrane-spanning domain of the beta chain is necessary for cell surface expression of the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 168:1971-1978.
134. Arnaud, J., Erard, M., Martin, E., Llobera, R., Gouaillard, C., Constans, J., and Rubin, B. 2001. Molecular modelling and endoplasmic reticulum retention of mutated TCR/CD3 complexes. *Scand J Immunol* 53:540-552.
135. Munoz-Ruiz, M., Perez-Flores, V., Garcillan, B., Guardo, A.C., Mazariegos, M.S., Takada, H., Allende, L.M., Kilic, S.S., Sanal, O., Roifman, C.M., et al. 2013. Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression. *BMC Immunol* 14:3.
136. de Villartay, J.P., Lim, A., Al-Mousa, H., Dupont, S., Dechanet-Merville, J., Coumou-Gatbois, E., Gougeon, M.L., Lemaître, A., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., et al. 2005. A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* 115:3291-3299.
137. Dave, V.P., Allman, D., Wiest, D.L., and Kappes, D.J. 1999. Limiting TCR expression leads to quantitative but not qualitative changes in thymic selection. *J Immunol* 162:5764-5774.
138. Schrum, A.G., Turka, L.A., and Palmer, E. 2003. Surface T-cell antigen receptor expression and availability for long-term antigenic signaling. *Immunol Rev* 196:7-24.
139. Ichinohasama, R., Miura, I., Takahashi, T., Yaginuma, Y., Myers, J., DeCoteau, J.F., Yee, C., Kadin, M.E., Mori, S., and Sawai, T. 1996. Peripheral CD4+ CD8- $\gamma\delta$ T cell lymphoma: a case report with multiparameter analyses. *Hum Pathol* 27:1370-1377.
140. de Souza, M.H., Hassan, R., Stefanoff, C.G., Maioli, M.C., Diamond, H.R., and Renault, I.Z. 2003. CD4+ $\gamma\delta$ T cell leukemia/lymphoma: clinical, immunophenotypic and molecular aspects in an unusual case. *Haematologica* 88:ECR27.
141. Wucherpfennig, K.W., Liao, Y.J., Prendergast, M., Prendergast, J., Hafler, D.A., and Strominger, J.L. 1993. Human fetal liver $\gamma\delta$ T cells predominantly use unusual rearrangements of the T cell receptor delta and gamma loci expressed on both CD4+CD8- and CD4-CD8- $\gamma\delta$ T cells. *J Exp Med* 177:425-432.
142. Aparicio, P., Alonso, J.M., Toribio, M.L., Marcos, M.A., Pezzi, L., and Martinez, A.C. 1989. Isolation and characterization of ($\gamma\delta$) CD4+ T cell clones derived from human fetal liver cells. *J Exp Med* 170:1009-1014.

-
143. Strominger, J.L., Fabbi, M., Prendergast, M., Maziarz, R.T., Burakoff, S.J., and Groh, V. 1989. Novel subsets of human T cells (CD4⁺ CD8⁻ TCR gamma delta and CD4⁻ CD8⁻ TCR alpha beta) and T-cell development. *Int J Cancer Suppl* 4:43-47.
 144. Morita, C.T., Verma, S., Aparicio, P., Martinez, C., Spits, H., and Brenner, M.B. 1991. Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. *Eur J Immunol* 21:2999-3007.
 145. Spinozzi, F., Agea, E., Bistoni, O., Forenza, N., Monaco, A., Falini, B., Bassotti, G., De Benedictis, F., Grignani, F., and Bertotto, A. 1995. Local expansion of allergen-specific CD30⁺Th2-type gamma delta T cells in bronchial asthma. *Mol Med* 1:821-826.
 146. Felices, M., Yin, C.C., Kosaka, Y., Kang, J., and Berg, L.J. 2009. Tec kinase Itk in gammadeltaT cells is pivotal for controlling IgE production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8308-8313.
 147. Qi, Q., Xia, M., Hu, J., Hicks, E., Iyer, A., Xiong, N., and August, A. 2009. Enhanced development of CD4⁺ gammadelta T cells in the absence of Itk results in elevated IgE production. *Blood* 114:564-571.
 148. Qi, Q., Kannan, A.K., and August, A. 2011. Tec family kinases: Itk signaling and the development of NKT alphabeta and gammadelta T cells. *FEBS J* 278:1970-1979.
 149. Odumade, O.A., Weinreich, M.A., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. 2010. Kruppel-like factor 2 regulates trafficking and homeostasis of gammadelta T cells. *J Immunol* 184:6060-6066.
 150. Nunez-Cruz, S., Aguado, E., Richelme, S., Chetaille, B., Mura, A.M., Richelme, M., Pouyet, L., Jouvin-Marche, E., Xerri, L., Malissen, B., et al. 2003. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* 4:999-1008.
 151. Wen, L., Barber, D.F., Pao, W., Wong, F.S., Owen, M.J., and Hayday, A. 1998. Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J Immunol* 160:1965-1974.
-

13 /

Anexos

1. Currículum Vitae

Beatriz Garcillán, PhD Immunology

www.researchgate.net/profile/Beatriz_Garcillan/

Gaztambide 68, 4ºA, 28003 Madrid, Spain

Phone: +34 636 699 104

beatrizgarcillan@gmail.com

Education

- Oct 2010 – Mar 2014** PhD, Immunology
Complutense University of Madrid, Spain
- Oct 2007 – Sep 2010** MS, Immunology
Complutense University of Madrid, Spain
- Oct 2000 – Jun 2006** BS, Biology
Complutense University of Madrid, Spain

Research Experience

- May 2008 – Present** **PhD Student**
Complutense University of Madrid, Department of Microbiology I, Madrid, Spain
Supervisor Prof. Dr. José R. Regueiro
Requirements of CD3 chains for TCR surface expression. Characterization of several human T cell immunodeficiencies
- Jan 2012 – May 2012** **Visiting PhD student**
Max Planck Institute of Immunobiology, Department of Molecular Immunology, Freiburg, Germany
Supervisor Prof. Dr. Wolfgang Schamel
- Sept 2010** **Visiting PhD student**
University of Amsterdam, Academic Medical Center, Department of Dermatology, Amsterdam, The Netherlands
Supervisor Dr. Pieter C. Res
- Sep 2006 – Apr 2008** **Research Assistant**
Complutense University of Madrid, Flow Cytometry and Microscopy Center, Madrid, Spain
Supervisor Prof. Dr. Agustín Zapata
Role of Eph/ephrins in chronic lymphocytic leukaemia
- May 2004 – Sep 2006** **Laboratory Assistant**
Complutense University of Madrid, Department of Anatomy and Human Embryology I, Madrid, Spain
Supervisor Prof. Dr. Concepción Martínez-Álvarez
Molecular and ethiopathogenic basis of cleft palate

Teaching Experience

- Oct 2008 – Jun 2013** **University Teaching Assistant**
Complutense University of Madrid, Department of Microbiology I
Madrid, Spain
Immunology practical classes to Medicine, Biochemistry and Pharmacy students (120 hours)
-

Journal Publications

- Garcillán B.**, Mazariegos M. S., Fisch P., Res P. C., Muñoz-Ruiz M., Gil J., López-Granados E., Fernández-Malavé E. and Regueiro J. R. Enrichment of the rare CD4⁺γδ T-cell subset in patients with atypical CD3δ deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 (Epub ahead of print 2013/12/03). IF: 12,0
- Muñoz-Ruiz M., Pérez-Flores V., **Garcillán B.**, Guardo A. C., Mazariegos M. S., Takada H., Allende L. M., Kilic S. S., Sanal O., Roifman C. M., López-Granados E., Recio M. J., Martínez-Naves E., Fernández-Malavé E. and Regueiro J. R. Human CD3γ, but not CD3δ, haploinsufficiency differentially impairs γδ versus αβ surface TCR expression. *BMC Immunol.* 2013; 14 (1):3. IF: 2,4 (highly accessed, May 2013)
- Mazariegos M. S., Muñoz-Ruiz M., Reiné J., **Garcillán B.**, Recio M. J., Fernández-Malavé E. and Regueiro J. R. Congenital TCR immunodeficiencies. *Inmunología.* 2013; 32 (3):94-101.
- Gil J., Busto E. M., **Garcillán B.**, Chean C., Garcia-Rodriguez M. C., Diaz-Alderete A., Navarro J., Reine J., Mencia A., Gurbindo D., Belendez C., Gordillo I., Duchniewicz M., Hohne K., Garcia-Sanchez F., Fernández-Cruz E., López-Granados E., Schamel W. W., Moreno-Pelayo M. A., Recio M. J. and Regueiro J. R. A leaky mutation in CD3D differentially affects αβ and γδ T cells and leads to a Tαβ⁻Tγδ⁺B⁺NK⁺ human SCID. *J Clin Invest.* 2011; 121 (10):3872-6. IF: 15,4
- Alonso C. L., Trinidad E. M., **Garcillán B.**, Ballesteros M., Castellanos M., Cotillo I., Muñoz J. J. and Zapata A. G. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Res.* 2009; 33 (3):395-406. IF: 2,4
- Martínez-Sanz E., Del Río A., Barrio C., Murillo J., Maldonado E., **Garcillán B.**, Amoros M., Fuerte T., Fernández A., Trinidad E., Rabadán M. A., López Y., Martínez M. L. and Martínez-Alvarez C. Alteration of medial-edge epithelium cell adhesion in two Tgf-beta3 null mouse strains. *Differentiation.* 2008; 76 (4):417-30. IF: 2,9
- Resel E., Martínez-Sanz E., Gonzalez I., Trinidad E., **Garcillán B.**, Amoros M., Alonso-Banuelos C., González-Meli B., Lagarón E., Murillo J., Del Río A., Barrio C., López M. and Martínez-Alvarez C. In vitro manipulation of cleft palate connective tissue: setting the bases of a proposed new treatment. *J Surg Res.* 2007; 138 (1):111-20. IF: 2,0

Submitted Articles

- Dopfer E. P., Oberg H. H., Siegers G. M., Fiala G. J., **Garcillán B.**, Regueiro J. R., Kabelitz D., Adams E., Minguet S., Wesch D., Fisch P. and Schamel W. W. A. The CD3 conformational change is not required for γδ T cell receptor activation, but enhances tumor killing. *Cell Reports* (sent, 2013).

Articles in Preparation

- Garcillán B.**, Mazariegos M. S., Jiménez-Reinoso A., Marín A. V. M., Muñoz-Ruiz M. and Regueiro J. R. CD3γ and CD3δ are required for surface TCR expression on mature T cells (in preparation, 2014)
- Garcillán B.**, Jiménez-Reinoso A., Marín A. V. M., Mazariegos M. S., Muñoz-Ruiz M. and Regueiro J. R. Differential diagnosis of human TCR/CD3 deficiencies (in preparation, 2014).
- Garcillán B.**, Guardo A.C, Perez-Flores V, Bass T, Martin-Fernandez J.M., Nielsen B.L., Geisler C., Schamel W.W.A. and Regueiro J.R. Clues about the role of CD3γ in TCR dynamics revealed by CD3γ/δ chimeras delivery (in preparation, 2014).
- Garcillán B.**, Mazariegos M.S., Jiménez-Reinoso A., Marín-Marín A., Muñoz-Ruiz M., Briones A., Recio M.J., Regueiro J.R. Congenital disorders of the T Cell Receptor. *LymphoSign Journal*; www.cdnsiencepub.com (requested review by Chaim M. Roifman ed., in preparation, 2014).
- Marín A. V. M., Mazariegos M. S., Jiménez-Reinoso A., Muñoz-Ruiz M., Aydogmus C. Y., Hocaoglu A., Cipe F., Regueiro J. R. and **Garcillán B.** Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in the zeta subunit of the TCR (in preparation, 2014).

Conference Proceedings

- Muñoz-Ruiz M., Mazariegos M. S., **Garcillán B.**, Sanz M., Delgado M., Fernández-Malavé E. and Regueiro J. R. CD3 haploinsufficiencies reveal the existence of differential CD3 chain functions in murine αβ T cell development, phenotype and function. In: *Proceedings of 15th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies ESID.* Etzioni A. and Gambineri E. eds. Medimond, pp105-110 (2013). ISBN 978-88-7587-666-1.

Conference Contributions

Attendance to several national and international meetings with frequent posters and some selected oral communications*

Sept 2012	European Congress of Immunology (EFIS). Glasgow, United Kingdom
May 2012	*Methods in PID Workshop (ESID). Kirschzarten, Germany
Jun 2010	*Spanish Congress of Immunology (SEI). San Sebastián, Spain
Sept 2009	European Congress of Immunology (EFIS). Berlín, Germany
May 2008	Spanish Congress of Immunology (SEI). Palma de Mallorca, Spain

Awards & Grants

Aug 2009- Aug 2013	Predocctoral fellowship from the Ministry of Education and Science
Jan 2012 - May 2012	Short-term fellowship from the Ministry of Education and Science
Jul 2008	English course scholarship from the Ministry of Education and Science
Aug 2007	English course scholarship from the Ministry of Education and Science
Oct 2005 – Jun 2006	Laboratory assistant fellowship from the Complutense University of Madrid

Skills & Activities

SKILLS Molecular Biology: PCR, RT-qPCR, lentiviral production, plasmid purification
Biochemistry: Immunoprecipitation, Western Blotting
Cell Biology: Flow cytometry, cell culture, magnetic-activated cell sorting, gene silencing by shRNA knockdown, confocal microscopy, T cell immortalization
Animal handling: mouse
Software: FlowJo, CellQuest Pro, Illustrator, Photoshop, InDesing, ImageJ, Image Studio, Endnote, GraphPad, Office

OTHERS Laboratory Animal Handling Course from the Complutense University of Madrid (2009)
 Recombinant Viruses Course from the Spanish National Research Council (2009)
 Radiological Protection Course from the Complutense University of Madrid (2011)
 Endnote Course from the Complutense University of Madrid (2012)

LANGUAGES Spanish
 English

SCIENTIFIC MEMBERSHIPS European Federation of Immunological Societies (EFIS)
 Spanish Society of Immunology (SEI)
 European Society of Immunodeficiencies (ESID)

2. Publicaciones



A leaky mutation in *CD3D* differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a $T\alpha\beta^-T\gamma\delta^+B^+NK^+$ human SCID

Juana Gil,¹ Elena M. Busto,² Beatriz Garcillán,² Carmen Chean,¹ Maria Cruz García-Rodríguez,³ Andrea Díaz-Alderete,¹ Joaquín Navarro,¹ Jesús Reiné,² Angeles Mencía,⁴ Dolores Gurbindo,¹ Cristina Beléndez,¹ Isabel Gordillo,¹ Marlena Duchniewicz,⁵ Kerstin Höhne,⁵ Félix García-Sánchez,⁶ Eduardo Fernández-Cruz,¹ Eduardo López-Granados,³ Wolfgang W.A. Schamel,⁵ Miguel A. Moreno-Pelayo,⁴ María J. Recio,² and José R. Regueiro²

¹Gregorio Marañón University Hospital, Madrid, Spain. ²School of Medicine, Complutense University, i+12 and RIER, Madrid, Spain.

³La Paz University Hospital, Madrid, Spain. ⁴Ramón y Cajal University Hospital, IRYCIS and CIBERER, Madrid, Spain.

⁵Faculty of Biology, Centre of Chronic Immunodeficiency (CCI), BIOS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg and Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany. ⁶Blood Transfusion Centre, Madrid, Spain.

T cells recognize antigens via their cell surface TCR and are classified as either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ depending on the variable chains in their TCR, α and β or γ and δ , respectively. Both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCRs also contain several invariant chains, including CD3 δ , which support surface TCR expression and transduce the TCR signal. Mutations in variable chains would be expected to affect a single T cell lineage, while mutations in the invariant chains would affect all T cells. Consistent with this, all CD3 δ -deficient patients described to date showed a complete block in T cell development. However, CD3 δ -KO mice have an $\alpha\beta$ T cell-specific defect. Here, we report 2 unrelated cases of SCID with a selective block in $\alpha\beta$ but not in $\gamma\delta$ T cell development, associated with a new splicing mutation in the *CD3D* gene. The patients' T cells showed reduced *CD3D* transcripts, CD3 δ proteins, surface TCR, and early TCR signaling. Their lymph nodes showed severe T cell depletion, recent thymus emigrants in peripheral blood were strongly decreased, and the scant $\alpha\beta$ T cells were oligoclonal. T cell-dependent B cell functions were also impaired, despite the presence of normal B cell numbers. Strikingly, despite the specific loss of $\alpha\beta$ T cells, surface TCR expression was more reduced in $\gamma\delta$ than in $\alpha\beta$ T cells. Analysis of individuals with this *CD3D* mutation thus demonstrates the contrasting CD3 δ requirements for $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cell development and TCR expression in humans and highlights the diagnostic and clinical relevance of studying both TCR isotypes when a T cell defect is suspected.

Introduction

T lymphocytes recognize antigens by means of a cell surface complex termed the TCR. The TCR contains 2 variable chains to bind antigens and several invariant chains to support variable chains and to transduce the signals required for T cell differentiation and antigen recognition (1). The invariant chains present in the human TCR are CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , and TCR ζ (CD247) (Figure 1A). T lymphocytes belong to either the $\alpha\beta$ or the $\gamma\delta$ lineage according to the types of variable chains incorporated into their TCR, α and β or γ and δ , respectively.

Mutations in *TCR* or *CD3* genes selectively impair T cell development (2). Unless hematopoietic stem cells are replaced, the mutations frequently cause early-onset SCID and death. When a variable chain such as TCR α is affected, only $\alpha\beta$ T cells are impaired, as shown recently (3). When an invariant chain is affected, both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells are either absent, as observed in CD3 δ or CD3 ϵ deficiency (4, 5), or reduced, as reported for CD3 γ or TCR ζ deficiency (6, 7). These immunophenotypes are described as $T^-B^+NK^+$ or $T^+B^+NK^+$, respectively. However, no selective $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cell-deficient patients have been reported

for invariant TCR chain deficiencies. We describe 2 SCID cases with severe selective $\alpha\beta$ T lymphopenia ($T\alpha\beta^-T\gamma\delta^+B^+NK^+$) caused by a leaky mutation in *CD3D* that titrated the differential CD3 δ requirements for human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocyte development and TCR expression in vivo.

Results and Discussion

Case reports. Two unrelated children from nonconsanguineous Ecuadorian parents showed common clinical and immunophenotypic features. They presented at 13 (AIII.1) and 5 (BII.2) months of age with SCID features, $T^+B^+NK^+$ phenotype, low CD3 expression, strongly impaired proliferative responses to T cell mitogens (Table 1), severe lymph node T cell depletion, and lack of activated germinal centers. Both received conditioning and haploidentical CD34 $^+$ peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation at 23 and 8 months, respectively.

Patient AIII.1 was admitted with failure to thrive, bronchopneumonia, severe diarrhea caused by strains of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Cryptosporidium*, oral candidiasis, and atopic dermatitis. CMV and EBV were negative by PCR. Neutrophil, lymphocyte, and platelet numbers and serum and urine biochemistry were normal, including Ig levels except IgE, which was strongly increased (Table 1). NK cell function was normal, whereas T cell-dependent B cell function was impaired. Specific Abs against protein antigens were not induced upon vaccination

Authorship note: Juana Gil and Elena M. Busto are co-first authors. María J. Recio and José R. Regueiro are co-senior authors.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest* doi:10.1172/JCI44254.